



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**DETERMINANTES BIOLÓGICOS DA COMORBIDADE  
DOS ATAQUES DE PÂNICO COM DEPRESSÃO E  
ANSIEDADE DE SEPARAÇÃO**

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas

**Jeyce Willig Quintino dos Santos**

Orientador:

**Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg**

Vitória, ES

**Tese de Doutorado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Fisiológicas do  
Centro de Ciências da Saúde da  
Universidade Federal do Espírito  
Santo, para obtenção do título de  
Doutora em Ciências Fisiológicas.**

Vitória, 22 de julho de 2011

Santos, JWQ

DETERMINANTES BIOLÓGICOS DA COMORBIDADE  
DOS ATAQUES DE PÂNICO COM DEPRESSÃO E  
ANSIEDADE DE SEPARAÇÃO.

Jeyce Willig Quintino dos Santos – Vitória, 2011.

Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal  
do Espírito Santo.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

1. Matéria cinzenta periaquedutal, 2. Rato, 3. Estimulação  
elétrica, 4. Reação de defesa, 5. Depressão, 6. Bulbectomia, 7.  
Desamparo aprendido., 8. Ansiedade de separação.

**DETERMINANTES BIOLÓGICOS DA COMORBIDADE DOS ATAQUES DE  
PÂNICO COM DEPRESSÃO E ANSIEDADE DE SEPARAÇÃO**

**Jeyce Willig Quintino dos Santos**

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade  
Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do Título de  
Doutora em Ciências Fisiológicas.**

**Banca Examinadora:**

---

**Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg (Orientador-UFES)**

---

**Profa. Dra. Miriam Stela Maris de Oliveira Costa (UFRN)**

---

**Profa. Dra. Samia Joca (USP-RP)**

---

**Profa. Dra. Rosana Suemi Tokumaru (UFES)**

---

**Profa. Dra. Cristina Martins e Silva (UFES)**

---

**Coordenador do PPGCF – Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg**

**Vitória, 22 de Julho de 2011**

**Aos meus pais**

“Longe, longe, ouço essa voz, que o tempo não vai levar”...

**Ao meu esposo Alexandre**

Pela compreensão, incentivo e principalmente pelo apoio e amor incondicionais nessa jornada. Obrigada por me ajudar a correr atrás dos meus sonhos.

**Aos meus filhos Alexandre e Gustavo**

Anjos presenteados por Deus, meu amor ilimitado.

**Aos meus alunos**

Motivo maior deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Luis Carlos Schenberg que sempre demonstrou acreditar no meu potencial e confiar no meu trabalho. Obrigada pela oportunidade oferecida, carinho, generosidade e o tempo que dedicou para transmitir os melhores e mais úteis ensinamentos. Agradeço, sobretudo, o privilégio de enriquecer meu conhecimento com suas argumentações e sugestões, sempre apresentadas de forma interessante e empolgante não só devido a sua competência mas também pela paixão e entusiasmo pela pesquisa científica.

À professora Dra. Miriam Stela Maris de Oliveira Costa do Departamento de Morfologia da UFRN, um agradecimento especial por ter me incentivado à pesquisa, pela cordial receptividade e valiosa parceria.

Ao professor Dr. Athelson Stefanon Bittencourt do Departamento de Morfologia da UFES, pela atenção, sugestões e interesse no desenvolvimento de nossas pesquisas.

Ao professor Dr. Nyam Florêncio da Silva do Departamento de Morfologia da UFES, sou imensamente grata pela cooperação e gentileza por disponibilizar equipamentos e materiais importantes para a análise e documentação dos resultados.

À professora Dra. Vanessa Beijamini Harris do Departamento de Farmácia da UFES, agradeço afetosamente pela disponibilidade e colaboração indispensável nas análises de imunoistoquímica.

À Professora Dra. Ana Paula Santana de Vasconcellos Bittencourt do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFES, pelo apoio, incentivo e opiniões valiosas.

Ao técnico Cristie Setubal Bernabé, pela competência profissional e envolvimento com os trabalhos do laboratório. Sua participação foi inestimável nos experimentos de imunoistoquímica.

À aluna Cláudia Torres Müller do laboratório de Neurobiologia, agradeço de modo particular a amizade, o apoio sempre presente e a ajuda fundamental nas análises estatísticas.

À aluna Vanessa Mendonça Alvarenga, pela participação em todas as etapas dos procedimentos de imunoistoquímica, sempre demonstrando entusiasmo, disposição e dedicação. Acredito que esta pesquisa contribuiu muito para sua iniciação científica.

A todos os colegas do laboratório de Neurobiologia pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados, estiveram presentes em distintos momentos contribuindo de alguma forma com a conclusão desta tese. Nada na vida conquistamos sozinhos. Sempre precisamos de outras pessoas para alcançar nossos objetivos.

Finalmente, a Deus por sempre me guiar e iluminar.

*“Se as coisas são inatingíveis... ora!  
Não é motivo para não querê-las...  
Que tristes os caminhos, se não fora  
A presença distante das estrelas!”*

(Mário Quintana)



## ABREVIATURAS

$\mu$ A	Microampere
5-HT	Serotonina
AP	Ataque de pânico
APA	Associação Psiquiátrica Americana
ASI	Ansiedade de separação na infância
BO	Bulbectomia olfatória
BOX	Ratos bulbectomizados
CA	Campo aberto
CCK	Colecistocinina
CE	Choque ecapável
CI	Choque inescapável
DA	Desamparo aprendido
DEF	Defecação
DM	Depressão maior
DSM	Manual de Estatística e Diagnóstico da Sociedade Americana de Psiquiatria
ECM	Estresse crônico moderado
EIC	Estimulação intracraniana
EP	Erro padrão
EPM	Erro padrão da média
EXO	Exoftalmia
GLP	Galope
I <sub>50</sub>	Intensidade efetiva
IMAO	Inibidores da monoaminoxidase
IMO	Imobilidade
IP	Intraperitoneal
IM	Intramuscular
ISRS	Inibidor seletivo de recaptção de serotonina
LCE	Labirinto-em-cruz elevado
LTE	Labirinto-em-T elevado
MCPA	Matéria cinzenta periaquedutal
MCPD	Matéria cinzenta periaquedutal dorsal

mCPP	Meta-clorofenilpiperazina
MHPG	3-metoxi-4-hidroxifenilglicol
MIC	Micção
NCMR	Núcleo central mediano da rafe
NDR	Núcleo dorsal da rafe
PAD	Procedimento de aprendizado de desamparo
PNF	Pré-teste da natação forçada
PTC	Perfusão transcardíaca
RFO	Ratos ficticiamente operados
SFP	Simulação de falar em público
SLT	Salto
TAG	Transtorno de ansiedade generalizada
TFMPP	Trifluorometilfenilpiperazina
TP	Transtorno do pânico
TRT	Trote

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	5
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
1. Modelos experimentais de transtornos de ansiedade e depressão .....	10
2. Modelos experimentais de depressão .....	13
2.1. Separação em primatas .....	13
2.2. Desamparo aprendido ( <i>Learned Helplessness</i> ) .....	14
2.3. Teste da natação forçada.....	15
2.4. Teste de suspensão da cauda .....	16
2.5. Bulbectomia olfatória.....	17
2.6. Estresse crônico moderado (ECM) .....	18
3. Modelos experimentais de ansiedade.....	19
3.1. Modelos baseados em punição.....	20
3.2. Modelos baseados na remoção ou redução da recompensa.....	20
3.3. Modelos etológicos de ansiedade .....	21
3.3.1. Transição claro-escuro .....	21
3.3.2. Labirinto-em-cruz elevado (LCE) .....	22
3.3.3. Labirinto-em-T elevado (LTE).....	23
3.3.4. Campo aberto ( <i>open field</i> ).....	25
3.3.5. Modelo da interação social .....	27
3.3.6. Encontros sociais e agressivos em camundongos .....	29
3.3.7. Comportamento social em primatas .....	29
3.3.8. Vocalização induzida pela separação materna .....	30
3.3.9. Privação materna na infância .....	31
3.4. Modelos baseados em estimulação intracraniana .....	33
3.3.1. Modelo de ataque de pânico por estimulação da matéria cinzenta periaquedutal.....	33
3.4. Modelos experimentais em humanos.....	34
3.4.1. Lactato .....	34
3.4.2. Ataques de pânico induzidos por fármacos .....	35
3.4.3. Falar em público .....	38
4. Comorbidade dos transtornos ansiosos e depressivos.....	39

<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	41
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	41
<b>ESTUDO I:</b> .....	42
<b>Efeitos da bulbectomia de ratos jovens nos comportamentos de defesa induzidos pela estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal na vida adulta</b> .....	42
Introdução.....	43
Material e métodos .....	47
Animais .....	48
Procedimentos .....	48
<i>Bulbectomia olfatória</i> .....	49
<i>Confecção dos eletrodos</i> .....	50
<i>Implantação do eletrodo na MCPD</i> .....	51
<i>Estimulação intracraniana</i> .....	52
<i>Teste de campo aberto</i> .....	52
<i>Teste do labirinto-em-T elevado</i> .....	53
<i>Teste da natação forçada</i> .....	53
<i>Histologia</i> .....	54
<i>Análise estatística</i> .....	55
Discussão .....	62
<b>ESTUDO II:</b> .....	68
<b>Efeitos do desamparo aprendido (<i>learned helplessness</i>) nos comportamentos de defesa induzidos pela estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal de ratos</b> .....	68
Introdução.....	69
Material e métodos .....	74
Animais .....	75
Procedimentos .....	75
<i>Procedimento de aprendizado de desamparo (PAD)</i> .....	76
<i>Labirinto-em-cruz elevado</i> .....	77
Resultados.....	79
Discussão .....	88

<b>ESTUDO III:</b> .....	95
<b>Efeitos da privação materna parcial ao longo da amamentação nos comportamentos de defesa induzidos pela estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal na idade adulta</b> .....	95
Introdução .....	96
Material e métodos .....	101
Animais .....	102
Procedimentos .....	102
<i>Privação materna</i> .....	103
Resultados .....	105
Discussão .....	109
<b>CONCLUSÕES</b> .....	116
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	117

## **RESUMO**

## **Determinantes biológicos da comorbidade de transtorno de pânico com a ansiedade de separação e depressão.** Santos JWQ,

*Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES.* **Objetivo:** A MCPD tem sido proposta como um substrato

importante nos ataques de pânico. Os dados clínicos sugerem que a ansiedade de separação na infância e a depressão predispõem aos ataques de pânico.

Assim, o presente estudo examinou os efeitos da privação materna (SM, um modelo de ansiedade de separação), o desamparo aprendido (DA, um modelo de depressão reativa) e a bulbectomia olfatória (BOX, um modelo de depressão endógena) sobre os limiares dos comportamentos de defesa induzidos pela estimulação elétrica da MCPD de ratos adultos. O desempenho dos ratos também foi avaliado nos testes de natação forçada (todos os grupos), labirinto-em-cruz elevado (PM, DA), labirinto-em-T elevado e campo aberto (BOX).

**Métodos:** **BOX:** Ratos machos jovens Wistar (P40) foram submetidos à bulbectomia olfatória (BOX, n = 22) ou ficticiamente operados (RFO, = 28). Após a idade adulta (P60), os ratos foram implantados com eletrodos na MCPD e estimulados com pulsos senoidais (60 Hz, 30 s) com aumentos graduais na intensidade de 5 mA, até a obtenção das respostas de galope e/ou salto (P65). Em seguida, os ratos foram submetidos aos testes de campo aberto (P66), labirinto-em-T elevado (P67) e natação forçada (P68). Os limiares dos comportamentos de defesa foram registrados e tratados por meio de regressão logística e comparados através da razão de verossimilhanças do teste do qui-quadrado. As respostas de esquiva do LTE foram analisadas por ANOVA para medidas repetidas seguida de testes-t para o critério de 5% de Bonferroni. As respostas do CA, NF e respostas de fuga do LTE foram analisadas por testes-t

de Student para amostras independentes. **DA:** Ratos machos adultos Wistar foram implantados com eletrodos na MCPD e mantidos em gaiolas individuais em um ambiente controlado. Cinco dias após a implantação, os ratos foram submetidos à estimulação intracraniana conforme descrito no estudo anterior. Os ratos que apresentaram galope com intensidades de corrente inferiores a 55 mA foram submetidos a um treinamento pareado de desamparo aprendido numa caixa de vaivém (tarefa: fuga de 1 via). As sessões de treinamento foram realizadas ao longo de 7 dias e consistiu na apresentação de 30 choques nas patas (1 mA, 30 s de duração, intervalo de 1 min) ou escapável (CE, n=23) ou inescapável (CI, n=23). O teste de déficit de aprendizagem de fuga (sessão-teste) foi realizado no dia após o período de treinamento na caixa de vaivém (tarefa: fuga de 2 vias). Os limiares das respostas de defesa induzidas pela estimulação elétrica da MCPD foram reavaliados 1 e 6 dias após a sessão-teste. Em seguida, os ratos foram submetidos ao labirinto-em-cruz elevado e natação forçada. Os limiares dos comportamentos de defesa bem como os demais testes seguiram os mesmos tratamentos estatísticos do grupo BOX.

**PM:** Ratas nulíparas Wistar prenhas foram mantidas num ambiente com luz e temperatura controladas durante o experimento. No dia após o parto (P1), os filhotes do sexo feminino foram sacrificados e os machos (4-8 por ninhada) foram mantidos com suas mães até o dia do desmame (P21). A separação materna parcial (3 h) foi realizada pela manhã em todo o período de lactação. Durante a separação, os ratos foram transferidos para novas caixas em que os ratos privados da mãe (P, n = 39) mantiveram-se sozinho e os ratos não-privados (NP, n = 30) permaneceram com suas mães. Em P60 os ratos foram submetidos à implantação de eletrodo na MCPD e estimulados em P65,



conforme descrito nos estudos anteriores. Em seguida, os ratos foram testados no labirinto-em-cruz elevado e natação forçada. Os limiares dos comportamentos de defesa bem como os demais testes seguiram os mesmos tratamentos estatísticos já descritos. **Resultados: BOX:** Comparados com os ratos RFO, os limiares dos ratos BOX foram menores para as respostas de exoftalmia ( $\Delta I_{50}\% = 150\% -32\%$ ,  $P < 0.001$ ), imobilidade ( $\Delta I_{50}\% = 150\% -18\%$ ,  $P < 0.05$ ), trote ( $\Delta I_{50}\% = 150\% -22\%$ ,  $P < 0.005$ ), galope ( $\Delta I_{50}\% = 150\% -14\%$ ,  $P < 0.005$ ) e salto ( $\Delta I_{50}\% = 150\% -19\%$ ,  $P < 0.005$ ). A atividade exploratória do campo aberto foi reduzida, sugerindo um aumento da ansiedade nos ratos BOX. No labirinto-em-T elevado, os efeitos da bulbectomia foram opostos aos da estimulação elétrica da MCPD e o teste da natação forçada confirmou o efeito pró-depressivo da bulbectomia olfatória. **DA:** Os grupos CI e CE apresentaram limiares basais praticamente idênticos para todas as respostas, exceto salto. Comparados ao grupo CE, os ratos do grupo CI apresentaram déficits significativos de desempenho na sessão-teste (fuga de 2 vias). Adicionalmente, enquanto o DA produziu apenas um aumento moderado nos limiares das respostas de defesa induzidas pela estimulação elétrica da MCPD no dia após a sessão-teste, eles foram acentuadamente aumentados seis dias após para os respostas de imobilidade (22%,  $P < 0,001$ ), trote (28%,  $P < 0,0001$ ) e galope (29%,  $P < 0,0001$ ). O teste da natação forçada confirmou os efeitos pró-depressivos do DA e no labirinto-em-cruz elevado foi observado um leve efeito ansiolítico. **PM:** Em relação aos controles, os ratos do grupo P mostraram uma acentuada redução nos limiares de imobilidade (-20%,  $P < 0,0001$ ), exoftalmia (-28%,  $P < 0,0001$ ), trote (-17%,  $P < 0,0001$ ), galope (-20%,  $P < 0,0001$ ) e salto (-13%,  $P < 0,005$ ). Não houve diferença entre os grupos nos

testes do labirinto-em cruz elevado e na natação forçada. **Conclusões:** Os nossos resultados mostram que a privação materna e o desamparo aprendido têm efeitos opostos sobre as respostas de defesa eliciadas pela estimulação elétrica da MCPD. Assim, os dados apóiam a influência da ansiedade de separação na infância nos ataques de pânico, contudo, não suportam o efeito da predisposição de estados depressivos agudos tipo desamparo aprendido. Por outro lado, observamos a influência facilitadora da bulbectomia olfatória na depressão endógena.

## **ABSTRACT**

**Biological determinants of the comorbidity of panic attacks with separation anxiety and depression.** Santos JWQ, Department of Physiological Sciences, Federal University of Espirito Santo, Vitória, ES.

**Aim:** The DPAG has been proposed as an important substrate of panic attacks. Clinical data suggest that childhood separation anxiety and depression predispose panic attacks. Accordingly, the present study examined the effects of mother separation (MS, a model of childhood separation anxiety), learned helplessness (LH, a model of dysthymic or reactive depression) and olfactory bulbectomy (BOX, a model of endogenous depression) on the thresholds of defensive behaviors induced by electrical stimulation of DPAG of adult rats. Rat performance was also evaluated in the forced swim test (FST) in all groups, in the elevated plus-maze (EPM) in MS and LH groups, and in elevated T-maze (ETM) and open-field (OF) in BOX group. **Methods:** **BOX:** Young male Wistar rats (P40) were either bulbectomized (BOX, n = 22) or sham operated (RFO, n = 28). Rats were implanted with electrodes in the DPAG in P60 and, 5 days after that, stimulated with stepwise increasing senoidal pulses (0-60  $\mu$ A; 60 Hz, 30 s) in steps of 5  $\mu$ A up to the production of galloping or jumping responses. Next, they were tested in the OF (P66), ETM (P67) and FST (P68). Defensive behaviors were examined through threshold logistic analysis and compared by likelihood ratio chi-square tests for  $P < 0.05$ . LTE avoidance responses were analysed by repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's t-tests. OF, FST and LTE escape responses were evaluated by Student's t-test for independent samples. **LH:** Male adult Wistar rats were kept in individual cages in a controlled environment as described. The DPAG of rats was stimulated as described 5 days after the electrode implantation. Rats which presented gallops

with currents below 60  $\mu$ A were subjected to LH yoked training of one-way shuttle-box escape throughout a 7-day period. LH training sessions consisted of the presentation of 30 footshocks (1 mA, 30 s duration, 1 min interval), either escapable (ES, n=23) or inescapable (IS, n=23), to control and LH rats, respectively. The escape learning deficit was examined the day after the training period in a new task of two-way shuttle-box escape (test-session). Thresholds of DPAG-induced defensive responses of both groups were reexamined 1 and 6 days after the test-session. Next, rats were tested in the EPM and FST. Responses were analysed as described. **MS:** Nulliparous pregnant Wistar rats were kept in a temperature- (23°C) and light-controlled room (12 x 12 h light-dark cycle). The day after parturition (P1), female pups were sacrificed and males (4 to 8 per litter) were kept with their dams up to the weaning day (P21). The MS (3 h/day) was carried out at morning throughout the lactation period. During MS, rats were moved to new boxes in which mother deprived rats (MDR, n=39) remained alone and non-deprived rats (NDR, n=30) were kept with their dams. DPAG electrodes were implanted in P60 and thresholds of DPAG-induced defensive responses were recorded in P65. Next, the rats were tested in the EPM and FST. Responses were analysed as above described. **Results: BOX:** Compared with sham-operated rats, BOX rat thresholds were lower for the DPAG-evoked responses of exophthalmus ( $\Delta I_{50}\%$  = 150% -32%,  $P < 0.001$ ), immobility ( $\Delta I_{50}\%$  = 150% -18%,  $P < 0.05$ ), trotting ( $\Delta I_{50}\%$  = 150% -22%,  $P < 0.005$ ), galloping ( $\Delta I_{50}\%$  = 150% -14%,  $P < 0.005$ ) and jumping ( $\Delta I_{50}\%$  = 150% -19%,  $P < 0.005$ ). Bulbectomy produced depression-like responses in the FST. On the other hand, although the bulbectomy reduced the exploration of the central area of OF, thereby suggesting an increase in anxiety,

LTE avoidance anxiety-like responses did not change. Thus, BOX rats presented opposite effects on panic-like escape responses of LTE and DPAG, which were either attenuated or facilitated, respectively. **LH:** IS and ES groups presented baseline thresholds virtually identical for all responses except jumping. Compared to ES group, IS rats showed significant deficits in escape performance in test-sessions. Moreover, whereas the LH produced only a moderate attenuation of DPAG-evoked defensive responses the day after the test-session, responses were markedly attenuated 6 days after that for immobility ( $\Delta I_{50}\% = 22\%$ ,  $P < 0.001$ ), trotting ( $\Delta I_{50}\% = 28\%$ ,  $P < 0.0001$ ) and galloping ( $\Delta I_{50}\% = 29\%$ ,  $P < 0.0001$ ). The FST confirmed pro-depressive effects of LH and the LCE test showed a mild anxiolytic trend. **MS:** Compared to controls, MS rats showed a marked reduction in the thresholds of immobility ( $\Delta I_{50}\% = -20\%$ ,  $P < 0.0001$ ), exophthalmus ( $\Delta I_{50}\% = -28\%$ ,  $P < 0.0001$ ), trotting ( $\Delta I_{50}\% = -17\%$ ,  $P < 0.0001$ ), galloping ( $\Delta I_{50}\% = -20\%$ ,  $P < 0.0001$ ) and jumping ( $\Delta I_{50}\% = -13\%$ ,  $P < 0.005$ ). There was no difference between groups in LCE and forced swimming tests. **Conclusions:** MS and LH have opposite effects on DPAG-evoked somatic defensive responses, either facilitating or inhibiting, respectively. Thus, whereas the present results support the predisposing influence of childhood separation anxiety in panic attacks, they do not support the facilitatory effect of acute depressive states. Otherwise, the effects of olfactory bulbectomy support the predisposing influences of endogenous depression in panic attacks. **Support:** AFIP, FAPES.

## **INTRODUÇÃO**

## 1. MODELOS EXPERIMENTAIS DE TRANSTORNOS DE ANSIEDADE E DEPRESSÃO

Espera-se que os modelos de transtornos psiquiátricos satisfaçam 3 condições: 1) *validade de face*: as respostas do modelo devem assemelhar-se aos comportamentos e sintomas do paciente, 2) *validade preditiva*: o modelo deve ser capaz de prever a ação de drogas e manipulações contextuais e comportamentais tal como ocorrem na clínica e, 3) *validade de construção*: o modelo deve ser consistente com os aspectos etiológicos e neurofisiológicos da condição clínica (Willner, 1984; Jenck *et al.*, 1995).

Contudo, o desenvolvimento de modelos experimentais dos transtornos psiquiátricos é bastante complexo, tanto em vista do desconhecimento da etiologia e dos processos fisiológicos subjacentes quanto da natureza freqüentemente subjetiva dos sintomas (Bourin *et al.*, 2001). Por exemplo, pacientes com depressão maior (DM) exibem humor deprimido, perda da autoestima, perda de interesse, anergia, anedonia, distúrbios do sono e apetite, sentimentos de culpa, dificuldade de concentração, retardo psicomotor, pensamentos recorrentes sobre a morte e tentativas de suicídio (Austin *et al.*, 2001; Tafet e Bernardini, 2003; Charney e Manji, 2004; Harvey *et al.*, 2004; Henn e Vollmayr, 2005; Yan *et al.*, 2010; Dinan e Scott, 2005; Hihn *et al.*, 2006; Kennedy, 2008). Conseqüentemente, os modelos disponíveis de depressão baseiam-se em aspectos limitados da validade de face das respostas comportamentais, da validade preditiva dos efeitos dos antidepressivos e da validade de construção quanto aos fatores ambientais que predispõem à depressão.



Os transtornos psiquiátricos também podem envolver fatores genéticos que, estima-se, ocorram em cerca de 30% dos pacientes com depressão (Kendler *et al.*, 1994; Kendler e Karkowski-Shuman, 1997; Bougarel *et al.*, 2011). Os fatores ambientais também jogam um papel importante, podendo interagir com os fatores genéticos (Kendler e Karkowski-Shuman, 1997; Fava e Kendler, 2000; Sullivan *et al.*, 2000). Por exemplo, estudos epidemiológicos mostram que eventos estressantes desencadeiam respostas e sintomas semelhantes aos da depressão (Gold *et al.*, 1988a, 1988b; Post, 1992; Dinan, 1994; Kendler *et al.*, 1999; Tafet e Bernardini, 2003; Czéh *et al.*, 2006; Alfonso *et al.*, 2005; Henn e Vollmayr, 2005; Hammack *et al.*, 2011) e constituem num fator de risco relevante ao desenvolvimento desta condição (Charney e Manji, 2004; Kendler *et al.*, 2001; Kessler, 1997). Também existem evidências de que o grau de controlabilidade do estresse modula o impacto dos estressores sobre o indivíduo. Assim, em condições de estresse crônico, o desenvolvimento de depressão seria facilitado se o indivíduo não tem controle sobre os estressores (Maier, 1984; Maier e Watkins, 2005, 2010; Maier *et al.*, 2006).

Por outro lado, os transtornos de ansiedade foram primeiramente classificados nos estudos pioneiros de Sigmund Freud (1896) sobre as “neuroses de ansiedade” (*Angstneurose*). Freud distinguiu estes transtornos da DM (*melancolia*) e de uma ampla gama de condições psiquiátricas denominadas à época de “neurastenias”. Nos “*Estudos Seleccionados sobre a Histeria*” (1896), Freud identificou duas síndromes fundamentais de ansiedade, quais sejam, a “expectativa ansiosa” ou “apreensão” (*Angstliche*), que ele considerava a forma predominante do transtorno de ansiedade, e uma

síndrome menos freqüente, porém igualmente importante, que ele denominou “ataque de ansiedad” (*Angstanfall*). De acordo com suas descrições, a expectativa ansiosa consistia num “*quantum de ansiedad livre e flutuante que controlava a escolha das idéias por antecipação*”. Em contraste, nos ataques de ansiedad a “*ansiedad irrompia repentinamente na consciência sem ter sido eliciada por qualquer idéia*”. Freud ressaltou que estes ataques podiam manifestar-se tanto como “*um sentimento puro de ansiedad*” quanto pela combinação da ansiedad com “*a interpretação mais próxima do término da vida, tal como a idéia de morte súbita ou da perda da razão*” ou combinados à “*alguma parestesia.....[ou ao] distúrbio de uma ou mais funções somáticas, tais como a respiração, atividade cardíaca, inervação vasomotora e atividade glandular*”. Eventualmente, Freud distinguiu estes ataques das fobias, do transtorno obsessivo-compulsivo (*neurose obsessiva*) e transtorno do estresse pós-traumático (*neurose comum*), dentre outras condições. Suas descrições clínicas da “expectativa ansiosa” e do “ataque de ansiedad” são bastante similares aos diagnósticos atuais do transtorno de ansiedad generalizada (TAG) e transtorno do pânico (TP), respectivamente (APA, 2000).

Contudo, enquanto a função fisiológica do humor permanece obscura, a ansiedad elicia respostas que consideramos necessárias para a sobrevivência da espécie. Conseqüentemente, os modelos dos transtornos de ansiedad são, quase sempre, “naturalísticos”, consistindo na eliciação ou intensificação das respostas naturais às ameaças ambientais (File, 1988). Os modelos biológicos de ansiedad baseiam-se, portanto, na premissa que a ansiedad torna-se patológica quando é crônica ou desproporcional ao

estímulo eliciador, gerando respostas mal adaptativas que prejudicam o desempenho do indivíduo.

Além da dificuldade inerente de modelagem dos fatores etiológicos e sintomas dos transtornos de ansiedade e depressão, os modelos experimentais são freqüentemente desenvolvidos para transtornos isolados. Portanto, descreveremos a seguir os principais modelos de depressão e ansiedade como introdução aos estudos subseqüentes que modelaram a comorbidade destes transtornos.

## **2. MODELOS EXPERIMENTAIS DE DEPRESSÃO**

### **2.1. Separação em primatas**

Talvez o modelo animal mais convincente de depressão seja a síndrome do desespero em macacos jovens separados de suas mães, ou de seus companheiros de gaiola, ou após o confinamento em câmaras verticais (Kraemer *et al.*, 1983). A síndrome consiste tipicamente de duas fases, quais sejam: uma fase inicial de protesto (*protest phase*) caracterizada por agitação e vocalização, seguida, alguns dias após, de uma fase de desespero (*despair phase*) com a redução acentuada nas brincadeiras e atividades sociais e o aumento dos comportamentos autodirigidos e de “enrodilhar-se”. Crianças separadas de suas mães apresentam sintomas depressivos similares às fases de protesto e desespero dos macacos. Contudo, após períodos prolongados de separação pode-se observar uma terceira fase, o desapego (*detachment*), na qual a criança desenvolve um comportamento de indiferença à figura materna (Bowby, 1983). Tratamentos farmacológicos com antidepressivos e choques

convulsivos similares aos da eletroconvulsoterapia (ECT), são eficazes para a reversão dos sintomas de depressão dos macacos, reproduzindo aspectos terapêuticos da depressão humana.

## **2.2. Desamparo aprendido (*Learned Helplessness*)**

O desamparo aprendido (DA) é um modelo cognitivo-comportamental, o qual sugere que a ausência de controle sobre o estresse (desamparo) seja um fator etiológico determinante no desenvolvimento da depressão (Seligman e Maier, 1967). Tipicamente, os efeitos da exposição a um choque inescapável (CI) incluem a redução da atividade motora espontânea, déficits no aprendizado de uma nova tarefa e aumento do medo condicionado (Maier, 1984; Maier e Watkins, 2005; Amat *et al.*, 2006; Baratta *et al.*, 2009; Hammack *et al.*, 2011). Experimentos pareados em que dois animais recebem os mesmos choques, mas apenas um pode desligá-los (*yoked design*), mostraram que o DA não decorre unicamente da intensidade, duração ou esquema de apresentação dos choques, mas da ausência de controle sobre os mesmos (Seligman e Maier, 1967). Seligman e colaboradores (1975) sugeriram que os animais aprendem que a resposta ao CI é inútil, gerando déficits cognitivos e motivacionais em tarefas futuras, tal como ocorre nos pacientes com depressão (Overmier e Seligman, 1967; Seligman e Maier, 1967; Miller e Seligman, 1975). Contudo, conforme Maier e colaboradores (1993) ressaltaram, outros autores propuseram que o déficit do aprendizado de fuga dos ratos submetidos ao CI seja devido à mera interferência de um intenso medo condicionado (ao contexto) e da respectiva resposta de congelamento no desempenho de fuga na caixa de vaivém. Um dos sintomas

mais importantes da depressão é a anedonia, ou seja, a incapacidade de sentir prazer. De fato, Vollmayr e colaboradores (2004) mostraram que ratos com DA consumiram menos solução açucarada do que os controles.

Os efeitos comportamentais do DA são “revertidos” por tratamentos crônicos, ou subcrônicos, com antidepressivos tricíclicos, antidepressivos atípicos (iprindrol e mianserina), inibidores seletivos da recaptação de serotonina (5-HT) e inibidores da monoaminoxidase (IMAO), administrados após a exposição aos choques inescapáveis, mas não por drogas ineficazes no tratamento da depressão, como os ansiolíticos, neurolépticos e estimulantes (ver Porsolt *et al.*, 1991). Portanto, o modelo de DA tem uma validade preditiva (Cryan *et al.*, 2002; Willner, 1986) e como tal tem sido usado para o estudo da neurobiologia da depressão e no desenvolvimento de antidepressivos (Velbinger *et al.*, 2000; Maier e Watkins, 2005).

### **2.3. Teste da natação forçada**

O teste da natação forçada (ou desespero experimental) é um modelo de depressão especificamente concebido para seleção de antidepressivos. Um dia após uma sessão preliminar de natação, ratos ou camundongos forçados a nadar num cilindro do qual não podem escapar exibem uma postura imóvel, apresentando apenas os movimentos necessários para manter a cabeça fora da água. Este modelo foi desenvolvido por Porsolt e colaboradores (1977) e sugere que a imobilidade reflete um estado depressivo dos animais que perderam a esperança de encontrar uma saída e se resignaram à situação.

Conceitualmente, o teste de natação forçada é similar ao procedimento de DA, uma vez que ambos os modelos requerem sessões preliminares de treinamento nas quais o animal “aprende” que não há possibilidade de fuga. O teste da natação forçada também tem sido comparado à síndrome de separação em macacos, na qual a imobilidade (desespero) é precedida por um período de atividade acentuada voltada à fuga (protesto).

Desde que foi proposto, o teste da natação forçada tem sido submetido à avaliação por muitos laboratórios. De acordo com Borsini e Meli (1988), a administração repetida da maioria dos antidepressivos clinicamente eficazes reduz a duração de imobilidade da natação forçada em ratos e em camundongos (87% e 94% dos antidepressivos testados, respectivamente). Portanto, no rato o tratamento parece ser mais seletivo (poucos falsos positivos), enquanto no camundongo o tratamento parece ser mais sensível (poucos falsos negativos). Contudo, um importante falso negativo é a virtual ausência de atividade dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina, particularmente, no rato, os quais são as drogas de primeira escolha no tratamento atual da depressão.

#### **2.4. Teste de suspensão da cauda**

Stéru e colaboradores (1985, 1987) propuseram uma variante do teste comportamental de desespero, no qual a imobilidade é induzida pela suspensão do camundongo pela cauda. A imobilidade induzida pela suspensão da cauda é atenuada por um número expressivo de antidepressivos clinicamente ativos, típicos e atípicos. Notavelmente, os inibidores seletivos de recaptação de 5-HT, que não apresentaram efeitos na natação forçada, tiveram

efeitos manifestos neste teste. Contudo, os inibidores da monoaminoxidase (IMAO) que foram claramente ativos na natação forçada mostraram efeitos bastante fracos no teste de suspensão da cauda.

## **2.5. Bulbectomia olfatória**

Os bulbos olfatórios são extensões bilaterais do telencéfalo rostral e constituem cerca de 4% do cérebro de um rato adulto (Song e Leonard, 2005). A destruição bilateral dos bulbos olfatórios ou bulbectomia olfatória (BO), interrompe as conexões eferentes e produz efeitos extensos e variados em várias regiões do cérebro, promovendo alterações complexas comportamentais, neuroquímicas, e neuroimunológicas que são similares àquelas encontradas em pacientes com DM (Jesberger e Richardson, 1988; Van Rinzen e Leonard, 1990; Kelly *et al.*, 1997; Cryan e Mombereau, 2004; Song e Leonard, 2005). Dentre os efeitos comportamentais similares à depressão destacam-se a anedonia, redução da atividade sexual, hipersensibilidade aos estressores e alterações do apetite. Contudo, enquanto as alterações do apetite podem ser secundárias à anosmia, a bulbectomia também produz inúmeros efeitos comportamentais que não têm relação claramente estabelecida com depressão, tais como o aumento do comportamento muricida, hiperatividade noturna, aumento da exploração do open-field (OF) e dos braços abertos do labirinto-em-cruz elevado (LCE), redução da esquiva passiva, da aversão gustatória ao LiCl e do desempenho dos animais em testes de memória espacial (labirinto de Morris) e operacional (labirinto radial) (Kelly *et al.*, 1997; Song e Leonard, 2005). Dentre as alterações bioquímicas, observa-se uma redução dos níveis de serotonina e

noradrenalina acompanhada do aumento da densidade dos receptores adrenérgicos  $\beta$  e  $\alpha_2$  e dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2</sub> (Kelly *et al.*, 1997; Song e Leonard, 2005). Os ratos bulbectomizados também apresentam um número expressivo de alterações do sistema imunológico que são similares às encontradas em pacientes com DM. Contudo, não foram observados efeitos claros sobre a secreção de corticosterona (Kelly *et al.*, 1997). Notavelmente, no entanto, os efeitos da bulbectomia foram em grande parte revertidos pelo tratamento crônico com antidepressivos (Jesberger e Richardson, 1986; Van Rinzen e Leonard, 1990; Kelly *et al.*, 1997).

## **2.6. Estresse crônico moderado (ECM)**

Este modelo foi inicialmente desenvolvido por Katz e colaboradores (Katz e Schmaltz, 1980; Katz *et al.*, 1981) e modificado posteriormente por Wilner (1997). A depressão ocorre pela exposição crônica dos animais, por períodos de cerca de 1 a 3 meses, a estressores de intensidade moderada apresentados de forma aleatória e intermitente (contenção, suspensão pela cauda, exposição de camundongos a ratos, privação de água ou comida, iluminação contínua, etc.). O modelo implica o estresse crônico como causa principal da depressão (Wilner e Papp, 1997). Os animais expostos ao ECM reduzem o consumo de sacarose e apresentam limiares de autoestimulação intracraniana mais elevados, sugerindo o desenvolvimento de anedonia, um sintoma central da depressão. Além disto, o ECM produz distúrbios do ciclo circadiano, aumento dos comportamentos de submissão no teste residente-intruso e redução do comportamento sexual em machos, dentre outros efeitos que persistem por várias semanas após o fim da



exposição aos estressores e que são similares aos sintomas encontrados na depressão (Gorka *et al.*, 1996; D'Aquila *et al.*, 1994). Em contraste, o ECM não teve efeitos significantes em testes de detecção de ansiedade, como a interação social e o LCE. O modelo responde seletivamente para drogas antidepressivas, as quais, por outro lado, não têm efeitos nos animais não estressados (D'Aquila *et al.*, 1997). Adicionalmente, os comportamentos similares à depressão somente são revertidos com os antidepressivos após 3 a 4 semanas de tratamento, tal como ocorre na clínica (Bourin *et al.*, 2001).

### **3. MODELOS EXPERIMENTAIS DE ANSIEDADE**

O desenvolvimento de modelos animais de ansiedade é particularmente importante. Na década passada, ansiedade e depressão eram consideradas entidades claramente distintas que deviam ser tratadas por ansiolíticos e antidepressivos, respectivamente. Contudo, estes transtornos ocorrem freqüentemente juntos e existem evidências bastante fortes da ação ansiolítica de várias drogas antidepressivas, tanto que elas têm sido amplamente empregadas na terapia da ansiedade. Embora esta situação dificulte o desenvolvimento dos modelos experimentais de ansiedade, a situação clínica é, de certa forma, mais simples que aquela do laboratório uma vez que os pacientes com DM apresentam sintomas típicos como idéias de morte ou tentativas de suicídio, retardo psicomotor e uma avaliação negativa global de sua existência, tanto passada quanto presente, ou futura, os quais são incomuns nos pacientes ansiosos. O desenvolvimento dos modelos experimentais também é dificultado pela heterogeneidade dos quadros clínicos de ansiedade, dentre os quais destacam-se os transtornos de ansiedade

generalizada, pânico, fobias, estresse pós-traumático, transtorno obsessivo-compulsivo e ansiedade de separação da infância. Não obstante, os modelos experimentais de ansiedade podem ser classificados em cinco categorias: 1) modelos baseados em punição, 2) modelos baseados na remoção ou redução da recompensa, 3) modelos etológicos de ansiedade, 4) modelos baseados em estimulação intracraniana, 5) modelos de ansiedade experimental em humanos.

### **3.1. Modelos baseados em punição**

Freqüentemente, estes modelos utilizam um choque elétrico para suprimir uma resposta mantida por reforço positivo (Howard e Pollard, 1991), ou utilizam a antecipação da punição, por meio de um estímulo condicionado, após um período prévio de condicionamento (Davis, 1991). Estes modelos são sensíveis aos ansiolíticos benzodiazepínicos, barbitúricos e etanol, mas não respondem aos antidepressivos tricíclicos.

### **3.2. Modelos baseados na remoção ou redução da recompensa**

Nestes modelos os animais são treinados a executar uma resposta (pressionar uma barra, correr até o final de um corredor, mover uma alavanca, etc) para receber uma recompensa. A seguir, a recompensa é removida (ou reduzida), gerando a extinção da resposta aprendida. A remoção do reforço foi associada à “frustração” de humanos. Como os benzodiazepínicos retardam a extinção da resposta e os antidepressivos não

têm efeito, a resistência à extinção foi relacionada ao efeito ansiolítico dos primeiros (Gray, 1987; Gray e McNaughton, 2000).

### **3.3. Modelos etológicos de ansiedade**

Nos modelos de origem etológica, a ansiedade é produzida por situações ou estímulos etologicamente relevantes para o animal, como nos modelos baseados em comportamento exploratório (exploração da arena, transição claro-escuro, labirintos, etc) e em comportamento social (interação social, comportamentos agonísticos, comportamentos de dominância/submissão, etc).

#### **3.3.1. Transição claro-escuro**

Este modelo foi desenvolvido por Crawley (1981) e baseia-se no número de transições realizadas pelo camundongo entre os compartimentos claro e escuro de uma caixa, sendo usado como uma medida de ansiedade. Os animais são colocados numa situação de conflito entre explorar um ambiente novo e a aversão à luz intensa do ambiente. O aumento de transições, sem alteração na atividade locomotora global, é considerado um indicador de atividade ansiolítica. Contudo, somente algumas linhagens de camundongos com um número elevado de transições espontâneas são sensíveis aos ansiolíticos, sugerindo que o modelo detecta predisposições genéticas.

### 3.3.2. Labirinto-em-cruz elevado (LCE)

Este teste usa um labirinto em formato de cruz, montado cerca de 50 a 70 cm acima do assoalho, no qual 2 braços opostos são circundados por paredes com cerca de 30 cm de altura (braços fechados ou seguros) e os outros 2 somente são circundados por um pequeno anteparo com cerca de 1 cm de altura (braços abertos ou inseguros). Os braços têm 50 cm de comprimento e se comunicam por uma plataforma central. A ansiedade é gerada pelo conflito entre a motivação de explorar e a aversão aos braços abertos (Zangrossi e Graeff, 1997; Carobrez e Bertoglio, 2005). De fato, ratos confinados nos braços abertos apresentam indícios comportamentais e fisiológicos de medo como redução da locomoção, reações de congelamento, defecação e aumento da concentração de corticosterona plasmática em relação aos ratos que foram confinados nos braços fechados. Não obstante, os ratos confinados nos braços fechados também apresentam níveis mais elevados de corticosterona que os controles mantidos na gaiola.

Estudos farmacológicos mostraram que a exploração dos braços abertos é aumentada por doses baixas de benzodiazepínicos (por exemplo, 1 mg/kg de diazepam, i.p.) e reduzida por substâncias ansiogênicas como a ioimbina, cafeína, pentilenotetrazol, e até mesmo psicoestimulantes como a anfetamina. Drogas sedativas e antidepressivas não afetaram a preferência aos braços fechados (Pellow *et al.*, 1985). A validação farmacológica deste modelo foi revisada por Handley e McBlane (1993). Segundo os autores, embora alguns ansiolíticos clássicos, como os benzodiazepínicos, causem o aumento

consistente da exploração dos braços abertos, as ansiolíticos serotoninérgicos (buspirona) produzem resultados altamente variáveis, sugerindo mecanismos distintos de ação (Handley e McBlane, 1993). O LCE também foi validado em camundongos (Lister, 1987). É importante notar que os efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos somente são observados na primeira exposição ao LCE, um efeito denominado tolerância de uma tentativa (*one-trial tolerance*) (Carobrez e Bertoglio, 2005). Embora este efeito tenha sido associado à alteração da natureza do estado emocional de medo inato para medo aprendido (Bertoglio e Carobrez, 2004), o medo aprendido também deveria ser sensível aos benzodiazepínicos. File e colaboradores analisaram o problema da natureza da aversão em 3 exposições sucessivas ao LCE, com e sem anteparo dos braços abertos (File e Zangrossi, 1993; Fernandes e File, 1996). A análise de fator revelou 3 componentes principais: 1) uma ansiedade sensível aos benzodiazepínicos similar à ansiedade generalizada ou ao medo de espaços abertos (Exposição 1, com ou sem anteparo), 2) uma ansiedade insensível aos benzodiazepínicos similar à fobia ou medo de altura (Exposição 2 sem anteparo) e 3) 2 tipos de ansiedade que não puderam ser identificados (Exposições 2 e 3 com anteparo). Portanto, a simplicidade do LCE é apenas ilusória.

### **3.3.3. Labirinto-em-T elevado (LTE)**

Este modelo é uma variação do LCE que possibilita o teste das respostas de medo inato e adquirido no mesmo animal (Graeff *et al.*, 1993; Viana *et al.*, 1994). O equipamento foi desenvolvido pela remoção

de um dos braços fechados do LCE. Contudo, as principais modificações residem num procedimento que avalia a aquisição da esquiva inibitória e a resposta inata de fuga, consecutivamente. Na aquisição da esquiva inibitória, registra-se a latência de saída do braço fechado (ou seja, a duração da esquiva ao braço aberto) em 3 tentativas consecutivas. Usualmente, a duração da esquiva aumenta significativamente a cada exposição, indicando a aquisição gradual da resposta. Na avaliação da resposta de fuga, o animal é colocado na extremidade de um dos braços abertos e registra-se a latência de entrada no braço fechado (latência de fuga do braço aberto). Presumivelmente, a esquiva ao braço aberto é um modelo de ansiedade generalizada, ou antecipatória, e a fuga do braço aberto um modelo de pânico.

O modelo foi validado para os ansiolíticos benzodiazepínicos (diazepam) e agonistas parciais de receptores 5-HT<sub>1A</sub> (buspirona, ipsapirona), os quais prejudicaram a aquisição da esquiva inibitória sem alterar a resposta de fuga (Graeff *et al.*, 1993, 1998). De forma similar ao observado na clínica, a administração crônica (21 dias) do inibidor seletivo de recaptação de serotonina (ISRS), escitalopram, também teve efeitos ansiolíticos (Pinheiro *et al.*, 2008). Contrariamente, a esquiva inibitória foi facilitada por agentes ansiogênicos (ioimbina, TFMPP, mCPP) (Graeff *et al.*, 1998). Corroborando os dados clínicos, a administração crônica do antidepressivo tricíclico imipramina atenuou tanto a esquiva quanto a fuga do braço aberto, reproduzindo os efeitos ansiolíticos e panicolíticos do tratamento crônico, respectivamente. No mesmo sentido, a administração aguda facilitou a esquiva ao braço

aberto, reproduzindo os efeitos ansiogênicos que podem ocorrer no início do tratamento clínico. Contudo, o tratamento agudo também atenuou a resposta de fuga, simulando efeitos panicolíticos que só são observados em humanos após 4 ou 6 semanas de tratamento com imipramina (Teixeira *et al.*, 2000). Não obstante, enquanto os tratamentos crônicos (21 dias) com ISRS (clomipramina, fluoxetina) não afetaram a esquia ao braço aberto do LTE, eles produziram uma atenuação significativa da resposta de fuga, fornecendo uma validação consistente desta resposta como um modelo de ataque de pânico (Poltronieri *et al.*, 2003). Por outro lado, nem os tratamentos agudos com ISRS, nem a buspirona tiveram qualquer efeito sobre a resposta de fuga. Contrariamente, a buspirona atenuou a resposta de esquia, reproduzindo seus efeitos ansiolíticos. Por fim, um estudo recente de Pinheiro e colaboradores (2008) mostraram que o tratamento crônico com o ISRS escitalopram teve efeitos tanto ansiolíticos como panicolíticos no LTE. Contudo, a administração aguda teve efeitos apenas ansiolíticos.

#### **3.3.4. Campo aberto (*open field*)**

O campo aberto tem sido utilizado desde as primeiras décadas do século passado como um equipamento útil para a medida de reatividade de ratos aos ambientes estranhos (Hall, 1941). Estes estudos foram ampliados por Broadhurst (1960a,b; 1975) que utilizou uma arena com cerca de 1 m de diâmetro, cujo assoalho foi subdividido em um círculo central e 2 anéis mais periféricos. Embora estes estudos pioneiros

tenham dado uma importância especial à “defecação emocional”, os trabalhos mais recentes avaliaram o comportamento exploratório do animal separadamente nas áreas central e periférica (Ossenkopp *et al.*, 1994; Ramos e Mormède, 1998). Segundo estes autores, enquanto o aumento da exploração da área periférica (peritaxia) refletiria um efeito psicoestimulante, a redução seria indicativa de um efeito sedativo sobre o comportamento. Por outro lado, aumentos ou reduções da centrotaxia (exploração ou número de cruzamentos da área central) seriam índices de efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos, respectivamente. De fato, Ossenkopp e colaboradores (1994) mostraram que a exposição repetida ao campo aberto produz um aumento da exploração da área central enquanto reduz a defecação, possivelmente, devido à diminuição da ansiedade pela habituação ao ambiente. Estudos com análise de fator também mostraram que a centrotaxia correlaciona-se positivamente com a exploração dos braços abertos do LCE, mas negativamente com a permanência no ambiente escuro, sugerindo que a centrotaxia reflete a redução da ansiedade (Ramos e Mormède, 1998). Assim, apesar de alguns resultados contraditórios, o registro separado da locomoção nas áreas central e periférica do campo aberto pode ser útil para a detecção dos efeitos de manipulações genéticas, ambientais ou farmacológicas sobre a ansiedade. De fato, Gentsch e colaboradores (1987) mostraram que a administração do benzodiazepínico clordiazepóxido aumentou a locomoção na área central, tanto em ratos com níveis reduzidos de ansiedade (SHR) quanto nos Wistar-Kyoto (WKY) que são presumivelmente mais ansiosos.



### 3.3.5. Modelo da interação social

Este modelo explora os efeitos ansiedade gerada por ambientes estranhos sobre a interação social de ratos. O teste baseia-se na observação de que o tempo que os pares de ratos gastam em atividades sociais (seguir, cheirar, heterolimpeza, passar sobre, passar sob, etc) é inversamente proporcional ao nível de ansiedade. Este modelo foi validado do ponto de vista comportamental, fisiológico e farmacológico (File e Hyde, 1978; File, 1980, 1985; File e Seth, 2003). Por exemplo, File e Hyde (1978) mostraram que a exposição a uma arena estranha, ou iluminada, reduz os comportamentos de interação social, independentemente de pistas olfatórias, uma vez que o efeito também foi observado em ratos anósmicos. Também foi demonstrado que a redução da interação social não resulta do aumento do tempo gasto com atividades não sociais. Contudo, a redução da interação social aumenta índices comportamentais de emocionalidade, tais como o congelamento e a defecação.

O teste de interação social é sensível aos ansiolíticos benzodiazepínicos e foi o primeiro a mostrar que antagonistas ou agonistas inversos destes receptores são ansiogênicos (File e Seth 2003). Dentre os últimos, o teste foi validado para o antagonista benzodiazepínico flumazenil e para os respectivos agonistas inversos ZK93426,  $\beta$ -CCE,  $\beta$ -CCP e FG7142 (File *et al.*, 1982, 1984, 1985, 1986; File e Lister, 1983; File e Pellow, 1984, 1985). O modelo também detectou efeitos ansiogênicos do fator liberador de corticotrofina (CRF) e da corticotrofina (ACTH), e efeitos ansiolíticos dos antagonistas dos

receptores para neuropeptídeo Y e substância P. Em contraste, o ansiolítico buspirona, um agonista parcial de receptores 5HT-1<sub>A</sub>, não apresentou efeitos consistentes, tal como ocorre em vários modelos de ansiedade em animais (File e Seth, 2003). O modelo também não pode ser validado em ratas, possivelmente, porque estas apresentam respostas menos intensas que os machos aos ambientes estranhos. Por outro lado, a predominância do comportamento agressivo em camundongos parece ser o fator impeditivo para o uso deste modelo nesta espécie (De Angelis e File, 1979; Lister e Hilakivi, 1988).

Por fim, é importante ressaltar que embora este teste seja apresentado como o primeiro modelo “etológico” de ansiedade e baseie-se na redução da interação social pela ansiedade (File e Seth, 2003), a etologia nos ensina que o medo foi um dos principais fatores na evolução dos laços sociais, tal como podemos observar no papel defensivo dos cardumes de peixes, rebanhos, ou da formação de laços grupais no homem. De fato, o homem busca a companhia até mesmo de estranhos na presença de uma ameaça (Eibl-Eibesfeldt, 1975). Adicionalmente, o medo também favorece formas de “interação social” na presença de ameaças contextuais. Assim, uma criança amedrontada sempre foge em direção à mãe e, em diversas espécies, o alvo da fuga é freqüentemente o animal dominante do grupo. Talvez por esta razão, o modelo não considera o “contato passivo” (coesão social?) como um comportamento de interação social, uma vez que este pode até mesmo aumentar em situações de perigo.

### **3.3.6. Encontros sociais e agressivos em camundongos**

Krsiak e colaboradores (1984) estudaram os efeitos de drogas no comportamento social entre camundongos que foram isolados por várias semanas e aqueles mantidos em grupo. Neste modelo, o tratamento foi direcionado aos animais isolados e as drogas ansiolíticas tenderam a aumentar o comportamento de investigação e reduzir o comportamento defensivo. Contudo, em vários casos os efeitos foram observados somente em subpopulações de camundongos previamente classificados como “tímidos” ou “agressivos”. É possível que estudos mais detalhados no comportamento destas subpopulações possam revelar os efeitos de drogas relacionadas à ansiedade mais do que numa população normal.

### **3.3.7. Comportamento social em primatas**

Há evidências, a partir de estudos em primatas, que a posição social pode influenciar respostas às drogas. Em macacos nos quais o comportamento de dominância é mais sensível às drogas ansiolíticas, os subordinados são sensíveis aos antidepressivos (Vellucci, 1991). Assim, dentro do mesmo grupo social é possível usar as respostas comportamentais para detectar tanto a ação de ansiolíticos quanto de antidepressivos. Estudos etológicos de fatores que levam ao desenvolvimento de hierarquias poderiam fornecer dados importantes na etiologia da ansiedade e depressão. Por exemplo, enquanto fatores como o estresse social e superpopulação têm efeitos importantes nos animais subordinados, a exposição à novidade produz efeitos mais marcantes nos dominantes.

### 3.3.8. Vocalização induzida pela separação materna

Existem vários estudos que tentaram usar a vocalização induzida pela separação para detectar atividade ansiolítica. Em particular, as chamadas ultrasônicas emitidas por filhotes de ratos separados de suas mães podem ser um índice adequado para detecção dos efeitos de drogas ansiolíticas (Insel *et. al.*, 1986; Gardner, 1985a,b). Contudo, é necessário cuidado na interpretação dos resultados. A redução na vocalização ultrasônica induzida por benzodiazepínicos pode tanto refletir a ação ansiolítica da droga quanto a sua ação sedativa, relaxamento muscular, efeitos de hipotermia ou depressão respiratória.

Recentemente, Blumberg e Alberts (1990) discutiram a função evolucionária do ultrassom em roedores, sugerindo interpretações improváveis em termos de respostas ansiolíticas. Várias espécies emitem vocalização induzida pela separação (Newman, 1991). Embora estas respostas sejam modificadas por ansiolíticos e antidepressivos, o modelo tem sido criticado em vista do papel fundamental do sistema opioidérgico nestas respostas. Notavelmente, no entanto, Preter e colaboradores sugeriram uma função central dos opióides nos ataques de pânico, uma vez que este sistema é o elo comum entre controle respiratório/sufocamento e relações parentais/ansiedade de separação, fundamentando a comorbidade clínica do transtorno de pânico e ansiedade de separação na infância (Preter e Klein, 2008). De fato, voluntários sadios pré-tratados com doses elevadas de naloxona exibiram respostas comportamentais e respiratórias ao lactato de sódio similares às observadas em pacientes de pânico (Preter *et al.*, 2011).

Contudo, o modelo de vocalização ainda não foi validado em relação ao pânico.

### **3.3.9. Privação materna na infância**

A privação materna é um modelo manifesto de separação parental. A perda dos cuidados maternos em animais e humanos significa a morte quase certa por fome ou predação (Kuhn e Schanberg, 1998). Conseqüentemente, o ambiente proporcionado pela mãe no período neonatal tem impactos psicológicos e neurobiológicos fundamentais no desenvolvimento de várias espécies, principalmente, mamíferos (Kuhn e Schanberg, 1998; De Bellis *et al.*, 1999; Pryce e Feldon, 2003). Vários estudos indicam a existência de uma forte correlação entre eventos traumáticos da infância e anormalidades comportamentais e neuroendócrinas na vida adulta (Kendler *et al.*, 1992; Furukawa *et al.*, 1999; Teicher *et al.*, 2003).

No modelo da privação materna, os animais são separados de suas mães por intervalos determinados antes do desmame. O modelo é bastante utilizado para o estudo dos efeitos da separação, tanto nos filhotes quanto nos pais, em vários sistemas fisiológicos e comportamentais. Como a mãe é a primeira ligação entre o filhote e o meio ambiente e a amamentação é um período de intenso desenvolvimento do cérebro, períodos longos de privação materna produzem alterações significativas das respostas ao estresse (Meaney *et al.*, 1993; Cirulli *et al.*, 1994; Francis e Meaney, 1999; Giovenardi *et al.*, 2000). Além da nutrição, os estímulos tácteis, olfatórios, auditivos e o

calor da mãe nos primeiros dias de vida são os estímulos mais importantes no desenvolvimento do sistema nervoso dos filhotes (Field *et al.*, 1988; Caldji *et al.*, 1998; Kuhn e Schanberg, 1998; De Bellis *et al.*, 1999; Gunnar, 2003; Newport *et al.*, 2002; Gluckman *et al.*, 2005). O tempo de separação também é um fator importante no tipo de resposta que será observada no rato adulto (Newport *et al.*, 2002). Segundo Zimmerberg e colaboradores (2003), a privação materna se assemelha à negligência materna na infância, correspondendo, portanto, ao transtorno clínico de ansiedade de separação na infância (ASI, *childhood separation anxiety*).

De acordo com o Manual de Estatística e diagnóstico da Sociedade Americana de Psiquiatria (DSM IV-TR, APA, 2000), a ASI é um transtorno no qual a separação da criança da figura de apego, geralmente a mãe, é acompanhada de ansiedade excessiva. Klein (1980, 1995) descreve a ASI como um conjunto de sintomas e comportamentos de ansiedade que refletem a ativação de um sistema específico de alarme que protege o jovem de rupturas reais, ou potenciais, dos laços familiares. No mesmo sentido, a Teoria do Apego de John Bowlby (1983) sugere que o relacionamento afetivo, íntimo e próximo, da mãe, ou figura materna, na primeira infância (1 a 3 anos de idade) é um fator fundamental para o desenvolvimento de uma personalidade segura. Ao contrário, a ausência do cuidado materno resultaria no desenvolvimento de “apego ansioso” (*anxious attachment*) e “personalidade insegura” no adulto, os quais seriam fatores

predisponentes de fobia, pânico e depressão (Bowby, 1982; Ainsworth e Bowlby, 1991; Bretherton, 1992).

### **3.4. Modelos baseados em estimulação intracraniana**

#### **3.3.1. Modelo de ataque de pânico por estimulação da matéria cinzenta periaquedutal**

A estimulação intracraniana de voluntários com eletrodos crônicos na matéria cinzenta periaquedutal produz ansiedade, pânico, terror e sentimentos de morte iminente acompanhados por sinais neurológicos e respostas viscerais que reproduzem os sintomas cardinais dos ataques de pânico (AP). A localização dos eletrodos por raios-X mostrou que os sítios eficazes encontravam-se na metade dorsal da matéria cinzenta periaquedutal (MCPD) (Nashold *et al.*, 1969, 1974). Estudos mais recentes com tomografia por emissão positrônica de ataques de pânico induzidos por infusão de lactato de sódio (ver item 3.4.1) corroboraram a possível participação da MCPD nos ataques de pânico (Reiman *et al.*, 1989). A MCPD de humanos também é ativada em resposta a ameaças próximas ou iminentes, um estado emocional que tem sido relacionado aos AP (Maren *et al.*, 2007; Mobbs *et al.*, 2007). De forma similar, a estimulação elétrica ou química da MCPD em animais tem sido proposta como um modelo consistente de AP (Gentil, 1988; Jenck *et al.*, 1995; Deakin and Graeff, 1991; Schenberg *et al.*, 2001; Schenberg, 2010). Em ratos, enquanto a estimulação da MCPD com estímulos de baixa magnitude produz a “reação de congelamento” caracterizada por imobilidade tensa e exoftalmia (protrusão do globo ocular e abertura

máxima das pálpebras), estímulos mais intensos dão origem a um comportamento vigoroso de fuga caracterizado por galopes e saltos que alcançam 1 m/s e 50 cm de altura, respectivamente (Bittencourt *et al.*, 2004; Schenberg *et al.*, 2005). Estes comportamentos são acompanhados por padrões distintos de respostas cardiovasculares e respiratórias e, menos freqüentemente, micção e defecação (Schenberg *et al.*, 1993; Bittencourt *et al.*, 2004). Estudos farmacológicos mostraram que a resposta de galope induzida pela estimulação da MCPD do rato foi seletivamente atenuada por panicolíticos administrados em doses e regimes similares aos empregados na clínica (Schenberg *et al.*, 2001, 2002; Vargas e Schenberg, 2001). Em contraste, os comportamentos de defesa induzidos por estimulação elétrica da MCPD não foram afetados por tratamentos ineficazes no TP, incluindo a administração aguda de antidepressivos e benzodiazepínicos (Schenberg *et al.*, 2001; Vargas e Schenberg, 2001) e os tratamentos agudos e subcrônicos (10 dias) com buspirona (Schenberg e Vargas, resultados não publicados).

### **3.4. Modelos experimentais em humanos**

#### **3.4.1. Lactato**

Pitts e McClure (1967) mostraram que os AP têm “marcadores fisiológicos” na medida em que eles podem ser precipitados pela infusão endovenosa de lactato de sódio (0,5 M) em pacientes predispostos. De fato, Cohen e White (1951) já haviam mostrado que os AP podiam ser precipitados por hiperventilação em 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), mas não no exercício ou na atmosfera ambiente (*apud* Klein, 1993a).



Estudos posteriores forneceram numerosas evidências das propriedades panicogênicas do lactato de sódio e CO<sub>2</sub>. De fato, Klein (1993) sugere que os ataques de pânico induzidos por estes agentes permanecem como os melhores modelos de pânico clínico, na medida em que eles não são precipitados em indivíduos saudáveis (Pitts e McClure, 1967; Klein, 1993a; Liebowitz *et al.*, 1985a) ou pacientes com transtorno obsessivo compulsivo (Gorman *et al.*, 1985) e fobia social (Liebowitz *et al.*, 1985b).

Os AP produzidos por infusão de lactato ou inalação de CO<sub>2</sub> também são bloqueados por tratamento crônico com antidepressivos tricíclicos (Liebowitz *et al.*, 1985c; Rifkin *et al.*, 1981; Woods *et al.*, 1990; Yeragani *et al.*, 1988), enquanto o pânico induzido por fármacos (ver item 3.4.2) não responde a estes agentes (Dorow *et al.*, 1983; Klein, 1993a). Contudo, pacientes com TAG e, mais notadamente, com transtorno pré-menstrual também são altamente sensíveis ao CO<sub>2</sub> (Lapierre *et al.*, 1984; Kent *et al.*, 2001). A sensibilidade dos pacientes com TP ao lactato e CO<sub>2</sub>, bem como os sintomas respiratórios acentuados dos AP, levou Klein e colaboradores a propor que os AP sejam alarmes falsos de sufocamento (Klein, 1993a,b; Preter e Klein, 2008; Shavitt *et al.*, 1992).

### **3.4.2. Ataques de pânico induzidos por fármacos**

Foram propostos 7 critérios para um agente farmacológico ser aceito como um panicogênico ideal (Guttmacher *et al.*, 1983; Gorman *et al.*, 1987): 1) o agente na dose panicogênica deve ser seguro para

administração de rotina em humanos, 2) os AP induzidos devem ser acompanhados por sintomas físicos e subjetivos de ansiedade, terror, medo, etc., 3) os pacientes devem julgar o ataque induzido como sintomaticamente idêntico, ou muito similar, aos AP espontâneos, 4) a indução de AP deve ser específica para pacientes com história de AP espontâneos (especificidade absoluta) ou os ataques devem ser induzidos em frequência maior nos pacientes que em indivíduos sadios (especificidade de limiar), 5) os efeitos do agente panicogênico devem ser consistentes em administrações repetidas no mesmo paciente (se houver dessensibilização, esta deve ser previsível com base nos dados da clínica), 6) drogas que bloqueiam os AP espontâneos, tais como os antidepressivos tricíclicos, inibidores da monoamina oxidase ou benzodiazepínicos de alta potência, também devem bloquear o AP induzidos farmacologicamente, 7) agentes que não bloqueiam o AP clínico não devem bloquear o AP induzido farmacologicamente.

Segundo Bradwejn e colaboradores (1993), a colecistocinina (CCK) satisfaz a maioria dos critérios para um panicogênico ideal e os dados pré-clínicos sugerem o seu envolvimento na neurobiologia da ansiedade. Em adição, enquanto a CCK tem efeito ansiogênico em modelos animais de ansiedade, seus antagonistas exercem efeitos ansiolíticos (Deupree e Hsiao, 1987; Hendrie e Dourish, 1990; Hughes *et al.*, 1990; Griez e Schruers, 1998).

Os AP também podem ser deflagrados por ioimbina, flumazenil,  $\beta$ -carbolina, cafeína, etc. (Graeff *et al.*, 2005). O estudo do mecanismo de ação de drogas panicogênicas pode ajudar a elucidar as bases

neuroquímicas dos AP e transtornos relacionados. Em particular, a infusão intravenosa de ioimbina produz AP em 63% dos pacientes com TP e em apenas 7% dos indivíduos saudáveis. Estes efeitos foram correlacionados ao aumento dos níveis de MHPG, o principal metabólito da NA, em pacientes de pânico, e com os aumentos dos níveis de cortisol tanto em pacientes quanto voluntários (Charney *et al.*, 1992). Os AP induzidos pelo antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico ioimbina têm sido relacionados à supressão do *feedback* negativo mediado por estes receptores em terminais e corpos neuronais, aumentando a liberação de noradrenalina e a taxa de disparos do lócus cerúleo, respectivamente (Grant e Redmond, 1981; Maas *et al.*, 1977).

Os agonistas inversos dos receptores benzodiazepínicos ( $\beta$ -carbolina) também produzem ansiedade em homens (Dorow *et al.*, 1983; Gentil *et al.*, 1990) e animais (Pellow e File, 1986). Em adição, Nutt e colaboradores (1990) observaram que até mesmo o flumazenil, um antagonista competitivo dos receptores benzodiazepínicos, precipitou AP em 8 de 10 pacientes administrados, mas não teve efeitos nos indivíduos sadios. Estes autores utilizaram o flumazenil para testar as hipóteses de que os transtornos de ansiedade possam ser devidos, de um lado, ao excesso de um agonista inverso endógeno ou, de outro, à deficiência de um ansiolítico endógeno. Assim, se a ansiedade for devida à presença de um agonista inverso endógeno, o flumazenil teria efeitos ansiolíticos em pacientes e neutros nos controles. Contrariamente, se o transtorno de ansiedade for devido a um déficit de um ansiolítico endógeno, então o flumazenil teria efeitos

ansiolíticos tanto em pacientes quanto nos controles. Os resultados mostraram que o flumazenil tem efeitos ansiogênicos nos pacientes de pânico, corroborando a possibilidade da existência de um ansiolítico endógeno. De fato, os ligantes endógenos do receptor benzodiazepínico têm sido propostos há várias décadas (Costa *et al.*, 1983; Guidotti *et al.*, 1983). Alternativamente, Nutt e colaboradores (1990) propõem que os receptores benzodiazepínicos dos pacientes de pânico podem apresentar um *set-point* alterado, qual seja, uma configuração anormal na qual o receptor seria menos sensível aos benzodiazepínicos e o flumazenil agiria como agonista inverso.

### **3.4.3. Falar em público**

Estudos epidemiológicos revelam que o temor de falar em público seja prevalente em estudantes (Geer, 1965) e independente de gênero, idade ou etnia (Phillips *et al.*, 1997). Além disso, o medo de falar em público é similar à fobia social, uma das formas predominantes de fobia (Furmark *et al.*, 1999; Stein *et al.*, 1994; Stein *et al.*, 1996; Brunello *et al.*, 2000). Um estudo comparativo mostrou que falar em público aumenta a ansiedade em voluntários saudáveis independente do traço de ansiedade (predisposição genética), enquanto o teste do conflito palavra-cor (Stroop color-word test), que foi proposto originalmente como um modelo de atenção, somente é ansiogênico em indivíduos com traço acentuado de ansiedade (Palma *et al.*, 1994).

A simulação de falar em público (SFP) foi originalmente desenvolvida por McNair e colaboradores (1982) para indução de

ansiedade experimental em humanos. Neste teste, um indivíduo é solicitado a proferir um discurso perante uma câmera de vídeo, a qual pode ser acionada para gravar seu desempenho. O teste também pode incluir medidas fisiológicas, tais como pressão arterial, frequência cardíaca, condutância elétrica da pele, respiração, etc. Em diferentes fases da sessão experimental, o indivíduo faz uma autoavaliação preenchendo escalas analógicas de quantificação de ansiedade e outros estados subjetivos.

Estudos farmacológicos mostraram que nem os ansiolíticos benzodiazepínicos, nem a buspirona afetam a ansiedade induzida no SFP, sugerindo sua similaridade ao pânico. Ao contrário, estes agentes reduziram a ansiedade medida antes e após o teste, sugerindo que esta seja similar à ansiedade generalizada ou à ansiedade antecipatória dos pacientes de pânico (Graeff *et al.*, 1985; Guimarães *et al.*, 1987, 1989; Zuardi *et al.*, 1993).

#### **4. COMORBIDADE DOS TRANSTORNOS ANSIOSOS E DEPRESSIVOS**

Pesquisas epidemiológicas das últimas décadas revelaram que os transtornos do humor e da ansiedade apresentam alta comorbidade. Estes estudos proporcionaram uma compreensão mais profunda da correlação e curso destes transtornos, bem como do seu prognóstico (Brown e Barlow, 1992; Kessler *et al.*, 1994; Dunner, 2001; Goodwin, 2002). Por exemplo, a ASI parece predispor o indivíduo ao desenvolvimento de diversas psicopatologias na vida adulta, em particular, a DM e o TP (Klein, 1993b; Blandin *et al.*, 1994;

Lipsitz *et al.*, 1994; Canetti *et al.*, 1997; Manicavasagar, 1998; Fava e Kendler, 2000; Heim e Nemeroff, 2001; Biederman *et al.*, 2004; Doerfler *et al.*, 2008; Klauke *et al.*, 2010; Mroczkowski *et al.*, 2011). Por exemplo, num estudo epidemiológico de *follow-up*, 41% dos pacientes com TP apresentaram crises depressivas no mesmo ano e 79% nos 10 anos seguintes (Angst e Wicki, 1993). Pacientes com transtornos comórbidos de depressão e ansiedade também apresentam sintomas mais severos e prognósticos menos favoráveis, exigindo tratamentos mais precoces e um número maior de hospitalizações. Estes pacientes também apresentam um risco maior de suicídio que aqueles com transtornos isolados (Coryell *et al.*, 1988; Fawcett, 1992; Lecrubier, 1998; Lecrubier e Ustün, 1998; Johnson e Lydiard, 1998; Kaufman e Charney, 2000; Kinley *et al.*, 2011).

Contudo, existem poucos estudos experimentais dedicados à modelagem da comorbidade dos transtornos psiquiátricos. Os estudos que se seguem buscaram modelar algumas destas condições, em particular, a comorbidade de transtornos depressivos e ansiosos com o TP. Para isto, combinamos o modelo de ASI por privação materna, bem como os modelos de depressão por bulbectomia e DA, com o modelo de ataques de pânico por estimulação elétrica da MCPD.

## OBJETIVO GERAL

Desenvolver modelos experimentais, em animais, da comorbidade de transtorno de pânico com depressão e ansiedade de separação.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar os efeitos da depressão por bulbectomia olfatória de ratos jovens nos comportamentos de pânico experimental induzidos pela estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal na vida adulta.
2. Verificar os efeitos da depressão por desamparo aprendido (*learned helplessness*) de ratos adultos nos comportamentos de pânico experimental induzidos pela estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal.
3. Verificar os efeitos da privação materna parcial ao longo da amamentação nos comportamentos de pânico experimental induzidos pela estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal dos ratos na idade adulta.

## **ESTUDO I:**

**EFEITOS DA BULBECTOMIA DE RATOS JOVENS NOS  
COMPORTAMENTOS DE DEFESA INDUZIDOS PELA  
ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA MATÉRIA CINZENTA  
PERIAQUEDUTAL DORSAL NA VIDA ADULTA**



## **INTRODUÇÃO**

O transtorno do pânico (TP) é um transtorno de ansiedade relativamente comum, com prevalência estimada entre 1% e 3% da população em geral (Brown and Barlow, 1992; Frank *et al.*, 2002; Kaufman and Charney, 2000). Estudos epidemiológicos demonstram que a ocorrência deste transtorno é 2 a 4 vezes maior em mulheres (Eaton *et al.*, 1994; Joyce *et al.*, 1989). O sintoma central desta condição é o ataque espontâneo de pânico (AP), que pode ocorrer várias vezes ao dia ou somente algumas vezes ao ano (Mezzasalma *et al.*, 2004). Os AP são definidos no DSM-IV como um período discreto de desconforto ou medo intensos acompanhados por pelo menos 4 dos seguintes sintomas: palpitações, tremores, suores, aumento da frequência respiratória, sensação de sufocamento, medo de morrer e medo de perder a razão. Contudo, Klein (1993a,b) sugere que os sintomas cardinais dos AP sejam dispnéia repentina, hiperventilação, pânico e desejo de fuga.

Atualmente, o TP é considerado como uma síndrome distinta tanto do transtorno de ansiedade generalizada (TAG) quanto dos outros transtornos de ansiedade (APA, 1994). Contudo, os pacientes com TP também se queixam freqüentemente de “ansiedade antecipatória”, isto é, do medo antecipado de desamparo na eventualidade de um AP, uma condição que pode agravar-se em “agorafobia” incapacitante. Adicionalmente, os AP apresentam alta comorbidade com depressão e ansiedade de separação, estados relacionados à sensação de desamparo e, indiretamente, à agorafobia (Cassano *et al.*, 1989; Klein, 1993b; Blandin *et al.*, 1994; Gorman, 1996; Gorman e Coplan, 1996; Johnson e Lydiard, 1998; Ballenger, 1998; Dunner, 1998, 2001; Kaufman e Charney, 2000).

Por outro lado, as respostas de defesa produzidas pela estimulação elétrica ou química da metade dorsal da matéria cinzenta periaquedutal (MCPD) têm sido propostas como um modelo de AP (Gentil, 1988; Jenck *et al.*, 1995; Deakin and Graeff, 1991; Schenberg *et al.*, 2001). Assim, enquanto a estimulação da MCPD com intensidades baixas produz a “reação de congelamento” (exoftalmia e imobilidade tensa), as intensidades mais elevadas desencadeiam respostas de fuga (trotes, galopes e saltos). Embora com menor frequência, a micção e defecação também são observadas em resposta à estimulação da MCPD (Schenberg *et al.*, 1993; Bittencourt *et al.*, 2004). Estudos farmacológicos mostraram que o galope induzido por estimulação elétrica da MCPD é seletivamente atenuado por panicolíticos administrados em doses e regimes similares aos da terapia do pânico (Schenberg *et al.*, 2001, 2002; Vargas e Schenberg, 2001). Embora estes resultados sejam indícios convincentes do envolvimento da MCPD nos AP, as causas da ocorrência espontânea destes ataques permanecem obscuras. Contudo, como o TP tem alta comorbidade com depressão e ansiedade de separação, estas condições podem ser fatores predisponentes importantes na maior vulnerabilidade dos indivíduos predispostos a estes ataques. Em particular, a depressão parece ser a condição mais frequentemente associada ao TP (Lecrubier, 1998; Lecrubier e Üstun, 1998). Num estudo epidemiológico, 41% dos sujeitos que tiveram AP sofreram depressão no mesmo ano e a taxa aumentou para 79% ao longo de 10 anos (Angst e Wicki, 1993). Adicionalmente, pacientes com TP e depressão apresentam ataques mais severos de pânico e um risco maior de suicídio (Jonhson e Lyard, 1998; Lecrubier, 1998; Lecrubier e Ustün, 1998; Kaufman e Charney, 2000).

Dentre os vários modelos de depressão em animais (Van Riezen and Leonard, 1990; Overstreet, 1993; Kelly *et al.*, 1997; Palanza, 2001), a remoção bilateral do bulbo olfatório, ou bulbectomia (BO), modifica o cérebro cronicamente e promove alterações complexas de parâmetros comportamentais, neuroquímicos, neuroendocrinológicos e neuroimunológicos, que são similares àsquelas encontradas em pacientes com depressão maior (Jesberger e Richardson, 1988; Van Rinzen e Leonard, 1990; Kelly *et al.*, 1997; Cryan e Mombereau, 2004; Song e Leonard, 2005). Por sua vez, a maioria das mudanças comportamentais e bioquímicas observadas nos ratos bulbectomizados (BOX) são atenuadas ou revertidas por tratamentos crônicos com antidepressivos (Jesberger e Richardson, 1986; Van Rinzen e Leonard, 1990; Kelly *et al.*, 1997). Assim, o modelo de bulbectomia olfatória proposto como modelo de depressão, apresenta uma fundamentação teórica consistente e validade preditiva, mostrando ser sensível em detectar sintomas que são fundamentais na patologia da depressão (Bourin *et al.*, 2001).

Portanto, para avaliar as bases biológicas da comorbidade de depressão e TP, o presente estudo examinou os efeitos da bulbectomia bilateral de ratos jovens nos limiares das respostas de defesa produzidas pela estimulação elétrica da MCPD na vida adulta.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## ANIMAIS

Ratos Wistar machos nascidos no nosso laboratório, foram criados com suas mães em caixas de polietileno (49 cm X 34 cm X 16 cm). Após o desmame, os filhotes foram acomodados em grupos de 4 animais até o 40º dia pós-natal (P40). Em seguida, os ratos foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos e alojados em caixas individuais com paredes de vidro e assoalho coberto com serragem. Os animais foram mantidos numa sala com temperatura controlada (23 °C) e ciclo claro-escuro (12 X 12 h, luzes acesas às 6:00 h), com água e ração *ad libitum*.

Os procedimentos foram aprovados e realizados estritamente de acordo com o comitê de ética no uso de animais desta Universidade (CEUA-UFES).

## PROCEDIMENTOS

Os ratos foram divididos em dois grupos, bulbectomizados (BOX, n=22) e ficticiamente operados (RFO, n=28), os quais foram submetidos à bulbectomia ou à cirurgia fictícia aos 40 dias de idade, respectivamente. Posteriormente, os ratos foram implantados com um eletrodo na MCPD (P60) e submetidos à estimulação intracraniana (P65) e aos testes de campo aberto (P66), labirinto-em-T elevado (P67) e natação forçada (P68), conforme na Tabela 1. Os pesos corporais foram registrados em P40 e ao término do experimento.

*Bulbectomy olfatória*

O procedimento cirúrgico para realização da bulbectomia bilateral foi descrito por Van Rizen e Leonard (1990). Conforme salientado por estes autores, tomou-se o cuidado para que houvesse a remoção completa dos bulbos olfatórios, sem causar danos às áreas vizinhas. Somente ratos que apresentaram bulbectomia completa foram utilizados no experimento (Figura 1).

Tabela 1. Principais etapas do experimento de depressão por bulbectomia (EIC: estimulação intracraniana, CA: teste de campo aberto, LTE: labirinto-em-T elevado, NF: natação forçada, PTC: perfusão transcardíaca).

Grupos	P40	P60	P65	P66	P67	P68	P69
BOX	Bulbectomia	Implantação do eletrodo	EIC	CA	LTE	NF	PTC
RFO	Operação fictícia	Implantação do eletrodo	EIC	CA	LTE	NF	PTC



Figura 1. Cérebro do rato bulbectomizado (acima) ou intacto (abaixo).

Os animais eram administrados com ceftriaxona sódica (30 mg/kg I.M.) e diclofenaco sódico (1 mg/kg, I.M.), anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/kg, I.P.) e fixados ao aparelho estereotáxico (David Kopf, EUA). Após a exposição do crânio, o osso frontal era trepanado cerca de 6 mm anterior ao bregma com uma broca odontológica diamantada (KG Sorensen 1016, São Paulo, SP). Em seguida, os bulbos olfatórios eram seccionados e aspirados com um escalpe® (calibre 16, Mallen, Rio de Janeiro, Brasil) acoplado a um aspirador hospitalar (DIA-PUMP® Modelo CA, Fanem, SP). A incisão era então suturada e tratada topicamente com antisséptico e rifamicina. Os RFOs eram submetidos aos mesmos procedimentos, todavia, sem secção e aspiração dos bulbos olfatórios. Ao final da cirurgia, os animais eram mantidos numa placa aquecida a 30 °C até a total recuperação da anestesia.

#### *Confecção dos eletrodos*

Os eletrodos eram confeccionados com um fio de aço inoxidável (Califórnia Fine Wire Company, Grover City, CA, EUA) de 250 µm de diâmetro, isolado em toda a sua extensão, com exceção da sua extremidade livre. Um outro fio de aço inoxidável, não isolado, servia como eletrodo indiferente. Os eletrodos eram soldados a um soquete de circuito integrado (Celis, BCPT 50, São Paulo, SP, Brasil).



### *Implantação do eletrodo na MCPD*

Em P60, os ratos eram anestesiados com hidrato de cloral (400mg/kg, I.P.) e fixados ao aparelho estereotáxico (David Kopf, EUA) com o bregma e o lambda no mesmo plano horizontal. Em seguida, realizava-se uma tricotomia da parte superior da cabeça e uma pequena área oval da pele e tecidos subcutâneos eram removidos, expondo-se a calota craniana à altura do lambda. Após a limpeza e secagem do campo, fazia-se 4 orifícios com o auxílio de uma broca odontológica, 2 em cada osso parietal e 2 nos interparietais, que serviam para a introdução de parafusos de aço inoxidável para fixação da prótese cirúrgica. A seguir, realizava-se a trepanação da região do lambda com uma broca adiamantada (KG Sorensen 1016), expondo-se o cérebro à altura do seio venoso. O centro da confluência dos seios era utilizado como referência para a implantação do eletrodo. Com o auxílio de uma agulha hipodérmica perfurava-se a dura-máter, afastava-se o seio venoso e introduzia-se o eletrodo em direção à região dorsolateral da MCPA de acordo com as coordenadas: 7,5 mm posterior ao bregma, 0,4 mm lateral ao plano sagital e 4,3 mm a partir da superfície do seio venoso. Em seguida, o fio indiferente era soldado a um dos parafusos fixados e o campo cirúrgico era preenchido com resina autopolimerizável (JET, São Paulo, Brasil), formando uma prótese sólida. Por fim, um tubo de plástico de 1 cm de altura e diâmetro era fixado sobre a prótese para a proteção do eletrodo e fixação do cabo de estimulação. Ao término da cirurgia os animais eram mantidos numa placa aquecida (30 °C) até a recuperação.

### *Estimulação intracraniana*

Cinco dias após a cirurgia, os ratos eram conectados a um estimulador de corrente constante de pulso senoidal (FDV, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por meio de um cabo leve e flexível acoplado a um conector giratório de mercúrio e colocados numa arena de acrílico transparente (*open-field*) de 60 cm de diâmetro e altura. Após um período entre 10 a 30 min de habituação, os ratos eram estimulados com pulsos senoidais (0-70  $\mu$ A, 60 Hz, 30 s) de intensidades crescentes em passos de 5  $\mu$ A, aplicados em intervalos de 3 a 5 min e monitorados por um osciloscópio (V-121 Hitachi-Denshi, Malásia). Os comportamentos eram registrados de acordo com um etograma descrito em estudos anteriores (Schenberg *et al.*, 2001, 2002, 2005; Vargas e Schenberg, 2001; Bittencourt *et al.*, 2004). Os comportamentos foram registrados de modo binário, ou seja, como 'emitidos' ou 'não', independentemente de sua frequência ou duração durante o período de estimulação. Os experimentos foram conduzidos num ambiente com som atenuado e temperatura controlada (23-25 °C).

### *Teste de campo aberto*

Neste teste o rato era colocado numa arena de acrílico transparente (*open-field*) de 60 cm de diâmetro e altura, com o assoalho dividido em 12 espaços, dos quais 4 compunham um círculo central e 8 compunham um anel periférico. O rato era filmado por 10 minutos com uma câmera digital SONY (Modelo DSC-W70). Os comportamentos de micção,

defecação, cruzamentos, locomoção periférica (peritaxia) e central (centrotaxia) foram quantificados *off-line* pela análise dos filmes.

#### *Teste do labirinto-em-T elevado*

O LTE é um equipamento obtido pelo fechamento de um dos braços fechados do LCE. Os ratos são avaliados quanto ao aprendizado da esQUIVA inibitória ou no desempenho numa resposta inata de fuga.

No treino da esQUIVA inibitória, o rato era colocado na extremidade do braço fechado por três vezes sucessivas (esQUIVAS 1-3), em intervalos de 30 segundos, registrando-se o tempo de permanência no braço fechado para cada tentativa. A aprendizagem da esQUIVA inibitória era expressa pelo aumento da duração da esQUIVA ao longo das tentativas. Após o treino de esQUIVA, o animal era colocado na extremidade do braço aberto, registrando-se a latência da fuga. O tempo de 300 segundos foi estabelecido como limite tanto para a duração da esQUIVA como para a latência de fuga. Os testes eram realizados numa sala com iluminação de 44 lux.

#### *Teste da natação forçada*

O teste da natação forçada (NF) foi conduzido num cilindro de acrílico de 28,5 cm de diâmetro por 62 cm de altura, e coluna d'água de 54 cm. Na sessão pré-teste (PNF) os ratos eram colocados no cilindro por 15 min. No dia seguinte (NF), os ratos eram filmados com uma câmera digital SONY (Modelo DSC-W70) durante 5 minutos. O comportamento de natação foi

definido como o nado propriamente dito, mergulhos ou tentativas de escalar as paredes do cilindro. Na imobilidade o animal permanecia praticamente imóvel, apresentando apenas pequenos movimentos para manter a cabeça fora da água. O tempo de imobilidade foi quantificado posteriormente pela análise dos filmes.

### *Histologia*

Ao término do experimento os ratos eram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/kg, I.P.), fixados a uma plataforma de perfusão e submetidos a uma toracotomia. Após a exposição do coração e da ligadura da aorta descendente, introduzia-se uma agulha no ventrículo esquerdo. Em seguida, o átrio direito era seccionado e realizava-se a perfusão com 200 ml de solução salina (NaCl 0,9 %) e 250 ml de solução de formaldeído (10 %) com o auxílio de uma bomba peristáltica (Masterflex CE 77120-70, Barrington, EUA). As cabeças eram mantidas por cerca de 10 dias em solução de formaldeído (10 %) para “molda” o trato do eletrodo e, em seguida, os cérebros eram retirados das caixas cranianas e mantidos por 2 dias adicionais em formaldeído. Por fim, os cérebros eram preparados em blocos do mesencéfalo e seccionados num micrótomo de congelamento (Jung AG, Heidelberg, Alemanha) em cortes de 40 µm de espessura. Os cortes eram estendidos em lâminas gelatinizadas, desidratados, corados com vermelho neutro (Sigma, EUA) e montados com DPX (Aldrich Chemical Company, EUA). Os sítios das estimulações foram identificados por lupa (Olympus Optical-SZ40, Japão),

fotografados (Sansung-SDC415ND, Coréia), e registrados em diagramas coronais do atlas do cérebro do rato de Paxinos e Watson (1998).

### *Análise estatística*

*Variáveis binárias:* As curvas de probabilidade das respostas à estimulação elétrica da MCPD foram obtidas pelo ajuste logístico das proporções das respostas limiares em função do logarítmo da intensidade de corrente, de acordo com o modelo:

$$P(y_{ij}|x_{ij}) = [1 + \exp(-(\alpha_j + \beta_j x_{ij}))]^{-1}$$

Onde: P é a probabilidade esperada da resposta  $y_{ij}$  para um dado estímulo  $x_{ij}$ ,  $\alpha_j$  é o intercepto e  $\beta_j$  a inclinação da *jésima* curva de intensidade-resposta (isto é, grupos BOX e RFO). Ajustes logísticos significantes foram avaliados pelo  $\chi^2$  de Wald ( $\chi^2_w = [\beta/EP]^2$ ), onde EP é o erro padrão de  $\beta_j$ .

As curvas intensidade-resposta dos grupos BOX e RFO foram parametrizadas por meio de variáveis indicadoras (0 e 1) e comparadas pela diferença dos desvios de verossimilhança do modelo completo (4 parâmetros) e dos modelos reduzidos (3 parâmetros), proporcionando valores de  $\chi^2$  com 1 grau de liberdade para comparações de locação ou paralelismo das regressões. Os  $\chi^2$  dos testes gerais de locação e paralelismo. O ajuste por máxima verossimilhança foi realizado pelo procedimento “Logistic” do programa SAS (SAS®, Cary, EUA). Os resultados foram descritos pelos limiares medianos ( $I_{50}$ ), bem como sua variação percentual ( $\Delta I_{50}\%$ ), e pelos respectivos erros padrões (EP) e intervalos de confiança (IC 95%) computados pelas fórmulas que se seguem:

$$\text{Log}(I_{50}) = -\alpha/\beta$$

$$I_{50} = 10^{-\alpha/\beta}$$

$$\text{EP}\{\text{Log}(I_{50})\} = \{[\text{Var}(\alpha) - 2(\alpha/\beta)\text{Cov}(\alpha, \beta) + (\alpha/\beta)^2\text{Var}(\beta)]/\beta^2\}^{1/2}$$

$$\text{EP}(I_{50}) = I_{50}\{\text{EP}[\text{Log}(I_{50})]\}$$

$$\text{IC95\%}(I_{50}) = I_{50} \pm 1,96\{\text{EP}(I_{50})\}$$

Onde, as variâncias (Var) e covariâncias (Cov) dos parâmetros foram obtidas pela matriz estimada de covariância do procedimento Logistic. A descrição detalhada destes métodos pode ser encontrada em Collett (2003).

*Variáveis contínuas:* Os efeitos da bulbectomia nas latências de fuga do LTE e nos comportamentos do CA e NF foram avaliados por testes-t de Student para amostras independentes. As respostas de esquiva do LTE foram avaliadas por ANOVA para medidas repetidas seguida por teste-t. As diferenças foram consideradas significantes para o nível descritivo de 5% (amostras pareadas) ou para o critério de 5% de Bonferroni (comparações múltiplas).

## **RESULTADOS**

*Sítios estimulados.* Os sítios estimulados localizaram-se predominantemente nas colunas dorsolateral e dorsomedial da MCPA (BOX= 90%, RFO= 65%). Os restantes localizaram-se em áreas contíguas da coluna lateral (RFO= 8%) e das camadas profundas do colículo superior (BOX= 10%, RFO= 27%) (Fig. 2).

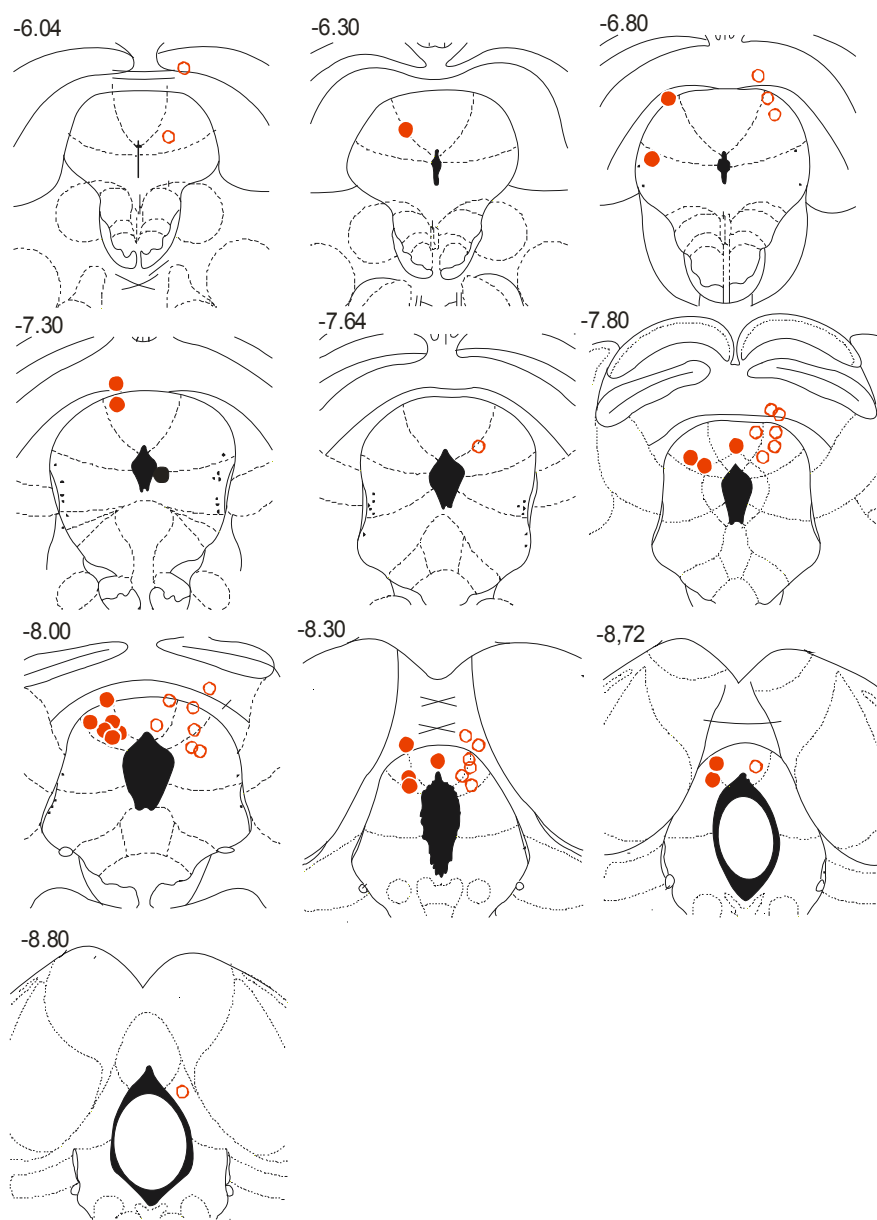


Figura 2. Sítios estimulados nos ratos bulbectomizados (círculos cheios) e ratos com operação fictícia (círculos vazios). Embora todos os eletrodos tenham sido implantados no lado direito do cérebro, eles foram representados em lados distintos para melhor visualização. Os números representam as coordenadas ântero-posteriores em relação ao bregma de cortes coronais do atlas do cérebro do rato de Paxinos e Watson (1998).



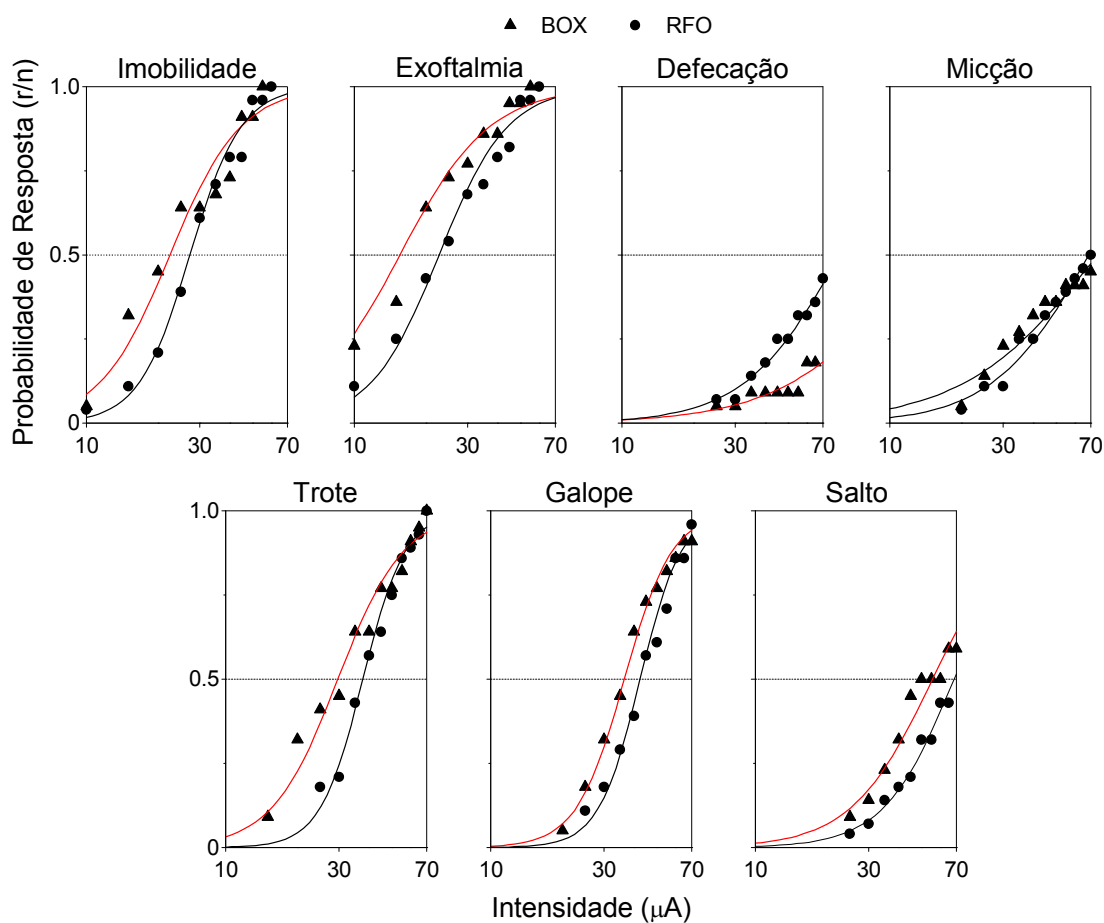


Figura 3. Efeitos da bulbectomia sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPD. As curvas intensidade-resposta representam o ajuste logístico das frequências acumuladas das respostas limiares.  $r$  - número de animais que apresentaram a resposta,  $n$  - número total de ratos estimulados. As linhas vermelhas indicam diferenças significantes em relação ao grupo RFO ( $P < 0,05$ , teste do  $\chi^2$  da razão de verossimilhanças para a locação das curvas).

*Efeitos da bulbectomia sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação da MCPA.* Comparados aos limiares das respostas de defesa dos ratos ficticiamente operados, os ratos bulbectomizados apresentaram uma redução significativa dos limiares de imobilidade ( $\Delta I_{50}\% = -18\%$ ;  $\chi^2 = 4,2$ ; 1 g.l.;  $P < 0,05$ ), exoftalmia ( $\Delta I_{50}\% = -32\%$ ;  $\chi^2 = 11,8$ ; 1 g.l.;  $P < 0,001$ ), trote ( $\Delta I_{50}\% = -22\%$ ;  $\chi^2 = 9,3$ ; 1 g.l.;  $P < 0,005$ ), galope ( $\Delta I_{50}\% = -14\%$ ;  $\chi^2 = 8,2$ ; 1 g.l.;  $P < 0,005$ ) e

salto ( $\Delta I_{50}\% = -19\%$ ;  $\chi^2=9,7$ ; 1 g.l.;  $P<0,005$ ). Contrariamente, os limiares de micção não foram alterados e os da defecação sofreram um aumento significativo ( $\Delta I_{50}\% = 119\%$ ;  $\chi^2=13,2$ ; 1 g.l.;  $P<0,0005$ ) (Fig.3).

*Efeitos da bulbectomia sobre a natação forçada.* Os ratos bulbectomizados apresentaram um tempo maior de imobilidade que os ficticiamente operados ( $163,1\pm7,5$  s versus  $129,1\pm9,6$  s,  $P<0,01$ ).

*Efeitos da bulbectomia sobre o desempenho no LTE.* As latências de exploração dos braços abertos apresentaram aumentos significativos ao longo das 3 exposições ao LTE ( $F_{2,62}=18,07$ ;  $P<0,0001$ ). Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos BOX e RFO (Tabela 2). Adicionalmente, a latência de fuga do braço aberto do grupo BOX foi estatisticamente maior que a do grupo RFO ( $98\pm26,1$  s e  $38,9\pm7,3$  s, respectivamente,  $P<0,03$ ).

Tabela 2. Duração da esQUIVA inibitória em 3 exposições sucessivas ao labirinto-em-T elevado de ratos bulbectomizados (BOX) ou ficticiamente operados (RFO). Os valores representam as durações em segundos (média $\pm$ EPM). \* e +  $P<0,05$ , estatisticamente diferente da EsQUIVA 1 e EsQUIVA 2, respectivamente (critério de 5% de Bonferroni).

Grupos	EsQUIVA 1	EsQUIVA 2	EsQUIVA 3
BOX	$27,5\pm18,3$	$99,7\pm34,9^*$	$136,9\pm37,2^*$
RFO	$37,6\pm17,0$	$97,1\pm28,4^*$	$212,0\pm28,9^{*+}$

*Efeitos da bulbectomia sobre a exploração da arena.* Os ratos BOX apresentaram atividade exploratória (periférica e central) e número de

cruzamentos da área central ligeiramente inferiores aos RFO ( $P<0,05$ ). Não foram observadas diferenças significantes para micção e defecação.

Tabela 3. Efeitos da bulbectomia sobre a exploração da arena. Os valores representam as médias $\pm$ EPM. \*  $P<0,05$ , estatisticamente diferente do grupo RFO (testes-t para duas amostras).

Grupos	Peritaxia	Centrotaxia	Cruzamentos	Micção	Defecação
BOX	31,1 $\pm$ 7,2*	3,2 $\pm$ 0,8*	1,0 $\pm$ 0,4*	0,1 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,5
RFO	48,4 $\pm$ 7,1	7,2 $\pm$ 2,1	2,9 $\pm$ 0,9	0,1 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,3

*Efeitos da bulbectomia sobre o peso corporal.* Os pesos corporais (média $\pm$ DPA) dos ratos BOX e RFO no momento da bulbectomia foram virtualmente idênticos (185,1 $\pm$ 23,4 g e 184,4 $\pm$ 25,0 g, respectivamente). Contudo, os ratos BOX apresentaram pesos significativamente inferiores aos RFO em P60, no momento da implantação do eletrodo (298,0 $\pm$ 51,9 e 342,3 $\pm$ 45,1 g, respectivamente,  $P<0,002$ ).

## **DISCUSSÃO**

Somente ratos com bulbectomia bilateral completa e sem lesão do córtex prefrontal foram utilizados neste estudo. Observações não sistemáticas durante o manuseio destes animais corroboraram o desenvolvimento de “irritabilidade” e resistência à captura sem, no entanto, atacar ou morder o experimentador. De fato, os relatos de alta agressividade de ratos bulbectomizados parecem ser devidos às lesões adicionais do córtex prefrontal, dentre outros fatores (Song e Leonard, 2005). Em todo caso, é importante notar que a irritabilidade é um sintoma encontrado em alguns pacientes com depressão (APA, 1994).

Confirmando observações anteriores (Kelly *et al.*, 1997), os ratos BOX apresentaram pesos inferiores ao término do experimento. Embora anósmicos, os ratos BOX tiveram contato oral permanente com os alimentos. Portanto, o menor ganho de peso pode ter sido devido à anedonia, uma característica central da bulbectomia em ratos (Romeas *et al.*, 2009) e da depressão humana (APA, 1994; Kennedy, 2008).

Os ratos BOX também apresentaram um tempo maior de imobilidade no teste de natação forçada, confirmando os efeitos pró-depressivos da bulbectomia verificados em outros testes comportamentais (Jesberger and Richardson, 1988; Song and Leonard, 2005; Kelly *et al.*, 1997).

No teste de campo aberto, os ratos do grupo BOX apresentaram atividade exploratória (periférica e central) e número de cruzamentos da área central ligeiramente inferiores aos RFO. Enquanto a redução da atividade exploratória periférica pode estar associada à redução dos comportamentos motivados por alimento (Leonard *et al.*, 1979) e sexual (Larsson, 1971; Lumia *et al.*, 1992), a redução dos cruzamentos da área central tem sido associada ao

aumento da ansiedade (Ramos *et al.*, 1997; Ramos e Mormède, 1998). Embora os nossos resultados corroborem o modelo de depressão por bulbectomia, outros autores relataram resultados opostos, com aumento da atividade exploratória no campo aberto (Klein e Brown, 1969; Van Riezen and Leonard, 1990) e redução da ansiedade em ratos bulbectomizados expostos ao LCE (Song *et al.*, 1996). Os resultados contraditórios podem ter sido devidos à realização da bulbectomia em ratos mais jovens (P40), ao diâmetro menor da nossa arena (60 cm), ou outras diferenças metodológicas (iluminação, etc).

No teste do LTE, ansiedade e pânico estão relacionados à esquiva e fuga dos braços abertos, respectivamente (Viana *et al.*, 1994; Zangrossi e Graeff, 1997; Graeff *et al.*, 1998). No presente experimento, não foram observadas diferenças entre os grupos BOX e RFO quanto à aquisição da resposta de esquiva, descartando efeitos tanto ansiolíticos quanto ansiogênicos. Por outro lado, a latência de fuga do braço aberto foi maior no grupo BOX, sugerindo um efeito panicolítico da bulbectomia. Contudo, não houve a exposição prévia dos ratos aos braços abertos do LTE, tal como têm sido usado nos experimentos mais recentes com este equipamento (Nascimento *et al.*, 2010).

Contrariamente, a bulbectomia teve efeitos panicogênicos no modelo de AP por estimulação da MCPD, produzindo uma redução expressiva, entre 14% e 22%, dos limiares das respostas de imobilidade, trote, galope, salto e, principalmente, exoftalmia, cujos limiares foram reduzidos em 32%. Estes resultados são dignos de nota uma vez que os sítios de estimulação dos ratos BOX e RFO foram bastante similares, localizando-se majoritariamente nas colunas dorsolateral e dorsomedial da MCPA.

Adicionalmente, é importante notar que os limiares de micção não foram alterados e os da defecação sofreram um aumento expressivo (119%). Assim, embora a defecação e a micção sejam usualmente associadas ao medo, o presente estudo e os anteriores sugerem que estas respostas sejam devidas à ativação concomitante de sistemas independentes daqueles que medeiam as respostas de exoftalmia, imobilidade, trote, galope e salto. De fato, além da defecação e micção apresentarem limiares mais elevados que as últimas respostas, a defecação não foi induzida pela estimulação da coluna dorsolateral da MCPA com ácido N-metil-D-aspartico (Bittencourt *et al.*, 2004; Schenberg *et al.*, 2005). Além disto, enquanto os tratamentos locais com bloqueadores de canais de cálcio (Schenberg *et al.*, 2000) e hormônio liberador da tireotrofina (Siqueira *et al.*, 2010) produziram uma atenuação acentuada da exoftalmia e respostas somáticas de defesa, eles não tiveram efeito algum sobre a micção e defecação. Contrariamente, a administração sistêmica de diazepam atenuou a micção e a defecação, mas não teve efeitos sobre as demais respostas de defesa (Schenberg *et al.*, 2001). Por fim, resultados recentes do nosso laboratório também mostraram que a tiroxina, o dióxido de carbono e o cianeto de potássio têm efeitos opostos sobre os dois conjuntos de respostas. Por outro lado, Blok e colaboradores (1997, 1998) mostraram que a MCPA também é ativada durante a resposta fisiológica de micção de humanos. Assim, embora as respostas de micção e defecação também possam ser elementos da resposta fisiológica de medo, as evidências acima sugerem que estas respostas são independentes das demais respostas de defesa induzidas por estimulação da MCPD. Este fato tem relevância clínica na medida que os

AP de humanos não são acompanhados por urgências de defecação ou micção (APA, 1994).

As respostas defensivas induzidas por estimulação da MCPD têm sido indistintamente propostas como um modelo experimental de AP (Gentil, 1988; Jenck *et al.*, 1995; Deakin e Graeff, 1991). Contudo, a bulbectomia não facilitou a micção e a defecação. Por outro lado, as evidências farmacológicas sugerem que o galope seja a resposta mais representativa do AP (Schenberg *et al.*, 2001). De fato, o galope induzido por estimulação da MCPD do rato foi seletivamente atenuado pela administração de fluoxetina em regime e doses similares aos empregados na terapia do TP (Schenberg *et al.*, 2001, 2002; Vargas e Schenberg, 2001). Ao contrário, enquanto o galope não foi afetado por drogas ineficazes na terapia do pânico, ele foi facilitado pelos panicógenos pentilenotetrazol, ioimbina e colecistocinina (Schenberg *et al.*, 2001; Jenck *et al.*, 1995; Bertoglio *et al.*, 2007). No mesmo sentido, a resposta natural de fuga dos roedores também apresenta perfil farmacológico compatível com o dos AP (Blanchard *et al.*, 2003). Em realidade, a bulbectomia teve efeitos facilitadores ainda maiores na imobilidade e, principalmente, exoftalmia. Estes efeitos são significativos uma vez que estas respostas apresentam os menores limiares de defesa tanto nos RFO do presente estudo quanto em ratos intactos de estudos anteriores (Bittencourt *et al.*, 2004). É possível, portanto, que enquanto o galope seja o estado mais representativo dos AP, a imobilidade e a exoftalmia possam estar relacionadas à ansiedade antecipatória.

A bulbectomia olfatória resulta em degeneração retrógrada de neurônios que se projetam para e a partir do bulbo olfatório, incluindo o hipocampo, amígdala, locus coeruleus, núcleo dorsal da rafe (NDR) e núcleo



central mediano da rafe (NCMR) (Song e Leonard, 2005; Jancsar e Leonard, 1983; Nesterova *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 2003). As alterações no sistema serotoninérgico observadas em ratos bulbectomizados (Jancsar e Leonard, 1984; Lumia *et al.*, 1992, Kelly *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 2003; Song e Leonard, 2005) são similares àsquelas dos pacientes com depressão maior (Mann, 1999). Notavelmente, a bulbectomia reduz a síntese de serotonina (5-HT) no NDR e NCMR, mas não em outras áreas do cérebro (Watanabe *et al.*, 2003). Estas alterações são revertidas por tratamentos crônicos com antidepressivos (Song e Leonard, 1995). Portanto, de acordo com o modelo proposto por Graeff e colaboradores (Deakin e Graeff, 1991, Graeff, 2004), a degeneração dos neurônios do NDR pode ser responsável pela facilitação dos comportamentos tipo-pânico da estimulação da MCPD, enquanto a degeneração dos neurônios do NCMR seria responsável pelos efeitos pró-depressivos da bulbectomia.

Portanto, a despeito dos resultados inconsistentes no LTE, a bulbectomia facilitou a imobilidade no teste da natação forçada, corroborando os efeitos pró-depressivos deste procedimento, reduziu a exploração da área central do campo aberto, sugerindo efeitos ansiogênicos, e facilitou os comportamentos de defesa produzidos pela estimulação da MCPD, reproduzindo os dados clínicos da alta comorbidade do pânico e depressão.

## **ESTUDO II:**

**EFEITOS DO DESAMPARO APRENDIDO (*LEARNED  
HELPLESSNESS*) NOS COMPORTAMENTOS DE  
DEFESA INDUZIDOS PELA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA  
DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL  
DE RATOS**

## **INTRODUÇÃO**

Os transtornos de humor englobam um grande grupo de condições psiquiátricas nas quais o humor patológico e perturbações associadas dominam o quadro clínico. Dentre estes, a depressão maior (DM) é um dos transtornos mais incapacitantes da psiquiatria (Fava e Kendler, 2000; Kulkarni e Dhir, 2007). Pacientes com DM exibem perda de energia e interesse, anedonia, distúrbio do sono e apetite, sentimentos de culpa, dificuldade de concentração, retardo psicomotor, pensamentos recorrentes sobre a morte e, inclusive, tentativas freqüentes de suicídio (Austin *et al.*, 2001; Tafet e Bernardini, 2003; Charney e Manji, 2004; Harvey *et al.*, 2004; Dinan e Scott, 2005; Hihn *et al.*, 2006; Kennedy, 2008). Um estudo da Organização Mundial de Saúde relatou que a depressão é a principal causa de incapacitação e a quarta causa na redução da vida produtiva do indivíduo, incluindo a morte prematura (Charney e Manji, 2004).

Por outro lado, indivíduos expostos a eventos estressantes podem desenvolver sintomas depressivos (Dolan *et al.*, 1985; Gold *et al.*, 1988a, 1988b; Post, 1992; Dinan, 1994; Kendler *et al.*, 1999; Tafet e Bernardini, 2003; Czéh *et al.*, 2006; Alfonso *et al.*, 2005; Henn e Vollmayr, 2005; Hammack *et al.*, 2011). Também há evidências de que o grau de controlabilidade do estresse modula o impacto dos estressores ambientais (Maier 1984; Maier e Watkins, 2010). Contudo, a depressão também pode envolver fatores predisponentes de natureza genética (Kendler e Karkowski-Shuman, 1997; Bougarel *et al.*, 2011).

Existem, no entanto, provas convincentes de que as experiências estressantes na infância como negligência ou perda dos pais, ou abuso físico ou sexual da criança, são fatores de risco importantes para o desenvolvimento da depressão na vida adulta (Cannetti *et al.*, 1997; McCauley *et al.*, 1997;

Repetti *et al.*, 2002; Heim e Nemeroff, 2001; Widom *et al.*, 2007). Uma abordagem amplamente aceita sugere, portanto, que a combinação de fatores genéticos, experiências estressantes da infância e estresse por períodos prolongados determinam a resposta do indivíduo a situações novas de estresse e sua vulnerabilidade aos transtornos psiquiátricos, incluindo a depressão (Charney e Manji, 2004).

Dentre os vários modelos experimentais de depressão (Porsolt *et al.*, 1991), o desamparo aprendido (DA) (*learned helplessness*) foi descrito originalmente por Seligman e Maier (1967) e baseia-se nos efeitos comportamentais da ausência de controle sobre o estresse. Estes efeitos incluem redução da atividade motora espontânea, déficits no aprendizado de uma nova tarefa e aumento do medo condicionado, dentre outros (Maier, 1984; Maier e Watkins, 2005; Amat *et al.*, 2006; Baratta *et al.*, 2009; Hammack *et al.*, 2011). Experimentos pareados em que dois animais recebem os mesmos choques, mas apenas um pode desligá-los (*yoked design*), mostraram que o DA não decorre dos choques em si, mas da ausência de controle sobre os mesmos (Seligman e Maier, 1967). Seligman e colaboradores sugeriram que os animais aprendem que a resposta ao choque inescapável é inútil, gerando déficits cognitivos e motivacionais em tarefas futuras, tal como ocorre na clínica (Overmier e Seligman, 1967; Seligman e Maier, 1967; Miller e Seligman, 1975). Notavelmente, os efeitos comportamentais do DA também foram “revertidos” por tratamentos crônicos, ou subcrônicos, com antidepressivos tricíclicos, antidepressivos atípicos (iprindrol e mianserina), inibidores seletivos da recaptação de 5-HT e inibidores da monoaminoxidase (IMAO), administrados após a exposição aos choques inescapáveis, mas não por drogas ineficazes no

tratamento da depressão, como os ansiolíticos, neurolépticos e estimulantes (Porsolt *et al.*, 1991). Portanto, o modelo de DA tem uma validade preditiva (Cryan *et al.*, 2002; Willner, 1986) e como tal tem sido usado para o estudo da neurobiologia da depressão e no desenvolvimento de antidepressivos (Maier e Watkins, 2005).

Por outro lado, o transtorno do pânico (TP) é um transtorno de ansiedade relativamente comum, com prevalência estimada entre 1% e 3% da população (Brown and Barlow, 1992; Frank *et al.*, 2002; Kaufman and Charney, 2000), sendo 2 a 4 vezes mais freqüente em mulheres (Eaton *et al.*, 1994; Joyce *et al.*, 1989 ). O sintoma central desta condição é o ataque espontâneo de pânico (AP), que pode ocorrer várias vezes ao dia ou somente algumas vezes ao ano (Mezzasalma *et al.*, 2004). Os AP são definidos no DSM-IV como um período discreto de desconforto ou medo intensos acompanhados por pelo menos 4 dos seguintes sintomas: palpitações, tremores, suores, aumento da freqüência respiratória, sensação de sufocamento, medo de morrer e medo de perder a razão. Contudo, os pacientes com TP também se queixam de “ansiedade antecipatória”, isto é, do medo antecipado de desamparo na eventualidade de um AP, uma condição que pode agravar-se numa “agorafobia” incapacitante. Adicionalmente, os AP apresentam alta comorbidade com, depressão e ansiedade de separação, estados relacionados à sensação de desamparo e, indiretamente, à agorafobia (Cassano *et al.*, 1989; Klein, 1993b; Blandin *et al.*, 1994; Gorman 1996; Gorman e Coplan, 1996; Johnson e Lydiard, 1998; Ballenger, 1998; Dunner, 1998, 2001; Kaufman e Charney, 2000).

Um modelo proposto para o estudo dos AP é a estimulação elétrica ou química da metade dorsal da matéria cinzenta periaquedutal (MPD) que elicia respostas de reação de defesa (Gentil, 1988; Jenck *et al.*, 1995; Deakin and Graeff, 1991; Schenberg *et al.*, 2001). Assim, enquanto a estimulação da MCPD com intensidades baixas produz a “reação de congelamento” (exoftalmia e imobilidade tensa), as intensidades mais elevadas desencadeiam respostas de fuga (trotes, galopes e saltos) (Schenberg *et al.*, 1993; Bittencourt *et al.*, 2004).

Estudos farmacológicos mostraram que o galope induzido por estimulação elétrica da MCPD é seletivamente atenuado por panicolíticos administrados em doses e regimes similares aos da terapia do pânico (Schenberg *et al.*, 2001, 2002; Vargas e Schenberg, 2001). Embora estes resultados sejam indícios convincentes do envolvimento da MCPD nos AP, as causas da ocorrência espontânea destes ataques permanecem obscuras. Contudo, vários estudos mostram que o TP é freqüentemente comórbido com depressão, agravando a condição clínica do paciente. De fato, Angst e Wicki, (1993) mostraram que 41% dos pacientes com TP sofreram de depressão ao longo de um ano, taxa que aumentou para 79% ao longo de 10 anos. Adicionalmente, pacientes com TP e depressão apresentam ataques mais severos de pânico e um risco maior de suicídio (Jonhson e Lyard, 1998; Lecrubier, 1998; Lecrubier e Ustün, 1998; Kaufman e Charney, 2000).

Portanto, para avaliar as bases biológicas da comorbidade da depressão e TP, o presente estudo examinou os efeitos do DA (um modelo de depressão) nos limiares das respostas de defesa produzidas pela estimulação elétrica da MCPD (um modelo de AP).

## **MATERIAL E MÉTODOS**



## **ANIMAIS**

Ratos Wistar machos, pesando entre 250 e 280 g, fornecidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, foram mantidos numa sala com temperatura controlada (23 °C) e ciclo claro-escuro (12 h X 12 h, luzes acesas às 6:00 h). Os animais foram alojados em gaiolas individuais com paredes de vidro (25 cm x 15 cm x 30 cm) e assoalho coberto com serragem com livre acesso à água e comida. Os procedimentos foram aprovados e realizados estritamente de acordo com o comitê de ética no uso de animais desta Universidade (CEUA-UFES).

## **PROCEDIMENTOS**

Os ratos foram implantados com eletrodos dirigidos à MCPD (ver Estudo I) e estimulados eletricamente, registrando-se as intensidades limiares de galope. Em seguida, ratos que apresentaram galopes com intensidades inferiores a 50  $\mu$ A (intensidade pico-a-pico, c.a., 60 Hz) foram divididos nos grupos choque-escapável (CE, n=23) e choque-inescapável (CI, n=23) e submetidos ao procedimento de aprendizado de desamparo (PAD) (ver abaixo). Os ratos foram submetidos a novas sessões de estimulação intracraniana no primeiro e no sexto dias após o término do PAD. Nos dias consecutivos, os animais foram submetidos aos testes de labirinto-em-cruz elevado (LTE) e natação forçada (NF) (Tabela 1). Os pesos corporais foram registrados no início e no término do experimento.

Tabela 1. Protocolo dos grupos choque-escapável e choque-inescapável. EIC - estimulação intracraniana, PAD – procedimento de aprendizado de desamparo, Fuga-1V – fuga de 1 via, Fuga-2V – fuga de 2 vias, LCE -labirinto-em-cruz elevado, NF -natação forçada, S -sacrifício.

Dia 1	Dia 5	PAD		Dia 14	Dia 19	Dia 20	Dia 21	Dia 22
		Dias 6-12	Dia 13					
Cirurgia	EIC-I	Fuga-1V	Fuga-2V	EIC-II	EIC-III	LCE	NF	S

Os procedimentos de confecção e implantação dos eletrodos, estimulação intracraniana, teste de natação forçada, histologia e análise estatística foram detalhados no Estudo I.

#### *Procedimento de aprendizado de desamparo (PAD)*

O desamparo foi induzido segundo o procedimento conjugado (*yoked*) de Seligman e Maier (1967). Para isto, foram utilizadas duas caixas de vaivém (*shuttle box*), sendo a caixa ativa e a caixa clone (Insight, Ribeirão Preto, Brasil). As caixas tinham 46 cm de largura, 25 cm de altura e 24 cm de profundidade e eram divididas por uma porta em compartimentos iguais. Além disto, elas possuíam tampas superiores e paredes anteriores de acrílico transparente e um assoalho com grades de aço inoxidável eletrificadas “em paralelo”, de forma que ambos os ratos recebiam choques de mesma intensidade, duração e programação. Os choques eram aplicados por meio de software específico e um gerador munido de dispositivo para alternância aleatória da polaridade das barras (*scrambler*). Contudo, somente a caixa ativa possuía sensores de infravermelho que desligavam o choque de ambas as

caixas (ativa e clone) quando o rato controle corria para o compartimento oposto.

Para o aprendizado do desamparo, os ratos CE e CI eram colocados nas respectivas caixas onde permaneciam por 1 minuto para habituação. Em seguida, eram aplicados 30 choques de 1 mA e 30 s de duração, em intervalos de 1 minuto e os ratos controles tinham de passar uma única vez pela porta para que o choque fosse desligado, a fuga de 1 via. Estas sessões eram conduzidas ao longo de 7 dias consecutivos (treino). No 8º dia, os grupos CE e CI eram testados individualmente em uma nova tarefa, a fuga de 2 vias. Nestas sessões, os ratos recebiam 30 choques de 1 mA e 10 s de duração (latência máxima da fuga de 2 vias), aplicados em intervalos de 1 minuto, e tinham que passar pela porta duas vezes para que o choque fosse desligado (sessão-teste) (Dalla *et al.*, 2008). Na sessão-teste o contexto era alterado com a fixação de fitas adesivas pretas nas paredes internas e colocação de um chumaço de algodão, embebido em essência de menta, sob o assoalho. A frequência e as latências médias das fugas acumuladas (1 e 2 vias) e a frequência média das fugas de 2 vias eram calculadas *online* pelo software do equipamento. Ao término de cada sessão, as caixas eram limpas com um pano umedecido com água e, em seguida, álcool.

#### *Labirinto-em-cruz elevado*

O LCE baseia-se na aversão natural dos roedores aos espaços abertos. O equipamento é feito de madeira com revestimento de fórmica e situa-se a 70 cm do assoalho. O LCE é formado por 4 braços perpendiculares

de 50 cm de comprimento e 10 cm de largura, dos quais 2 braços opostos apresentam paredes de 40 cm de altura (braços fechados) e os outros 2 uma borda de apenas 1 cm de altura (braços abertos). Os braços comunicam-se por uma plataforma central (10 x10 cm).

Os ratos eram colocados na plataforma central voltados para o braço fechado e eram observados durante 5 minutos, registrando-se os tempos de exploração no braço aberto (TBA) e no braço fechado (TBF) e tempo na plataforma central (TPC) e o número de entradas nos braços abertos (EBA) e braços fechados (EBF). A porcentagem de entradas no braço aberto (%EBA) e porcentagem de tempo no braço aberto (%TBA) foram calculados como  $EBA/(EBA+EBF)$  e  $TBA/(TBA+TBF)$ , respectivamente. Os testes foram realizados numa sala com iluminação de 44 lux e filmados com uma câmara digital SONY (Modelo DSC-W70).

## **RESULTADOS**

*Sítios estimulados.* A localização dos eletrodos dos grupos CI e CE foi bastante similar. Assim, com exceção de 4 eletrodos do grupo CI (18%) e 4 do grupo CE (17%) situados em áreas adjacentes das camadas profundas do colículo superior, os demais localizaram-se nas colunas dorsolateral (CI – 77%, CE – 70%) e lateral (CI – 5%, CE – 13%) da MCPA. Os eletrodos da coluna lateral de ambos os grupos localizaram-se nas áreas mais caudais da MCPA (-8,0 a -8,3 mm posteriores ao bregma).

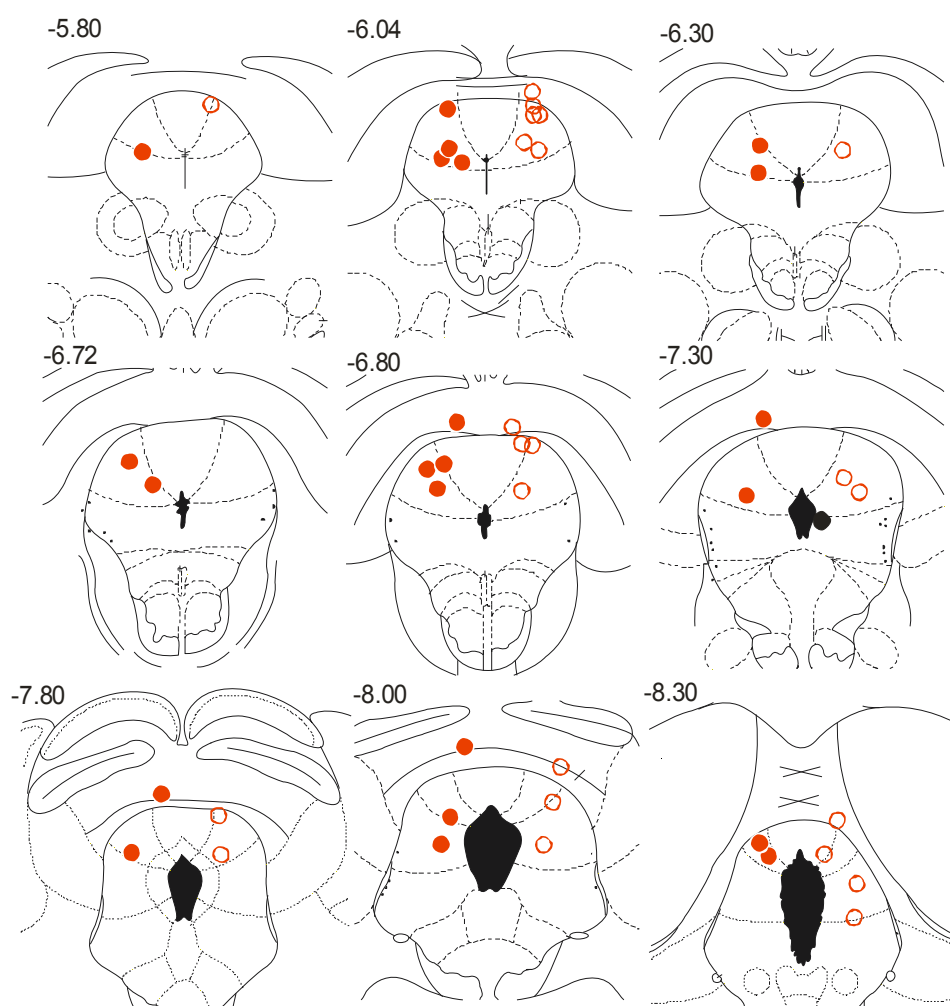


Figura 1. Sítios estimulados nos ratos submetidos ao choque inescapável (círculos cheios) e choque escapável (círculos vazios). Embora todos os eletrodos tenham sido implantados no lado direito do cérebro, eles foram representados em lados distintos para melhor visualização. Os números representam as coordenadas ântero-posteriores em relação ao bregma de cortes coronais do atlas do cérebro do rato de Paxinos e Watson (1998).

*Aprendizagem do Desamparo.* Os ratos submetidos ao choque inescapável nas sessões de treinamento (Dias 6-12) apresentaram déficits significantes do aprendizado da fuga de 2-vias na sessão-teste (Dia 13) (Tabela 2).

Tabela 2. Número médio ( $\pm$ EPM) de travessias e fugas de 2-vias e latência média das fugas de 2-vias ( $\pm$ EPM) dos grupos CI e CE na sessão-teste (8º dia). \*\*,  $P < 0,001$ ; \*\*\*,  $P < 0,0001$ , diferenças significantes em relação ao grupo CE (teste-t para amostras independentes).

Grupos	Nº de Travessias	Fugas de 2 vias	
		Número	Latência
CI	13,5 $\pm$ 2,5***	3,6 $\pm$ 0,9***	4,2 $\pm$ 0,4**
CE	33,5 $\pm$ 2,3	10,4 $\pm$ 1,3	2,8 $\pm$ 0,2

*Efeitos da exposição ao choque inescapável sobre os limiares das respostas defensivas produzidas por estimulação da MCPD.* Exceto para a resposta de salto, cujos limiares foram ligeiramente inferiores para o grupo CI ( $\Delta I_{50}\%$  = -11%;  $\chi^2$  = 4,14; 1 g.l.;  $P < 0,05$ ), não foram observadas diferenças significantes dos limiares basais das respostas de defesa de ambos os grupos (Fig.2).

Comparados aos limiares do grupo controle, o grupo CI apresentou aumentos pequenos, porém, significantes, no dia seguinte à sessão-teste, nos limiares de imobilidade ( $\Delta I_{50}\%$  = 11,6%;  $\chi^2$  = 4,7; 1 g.l.;  $P < 0,03$ ), trote ( $\Delta I_{50}\%$  = 11,4%;  $\chi^2$  = 6,9; 1 g.l.;  $P < 0,01$ ) e galope ( $\Delta I_{50}\%$  = 8,8%;  $\chi^2$  = 4,9; 1 g.l.;  $P < 0,05$ ). Em contraste, houve uma redução acentuada dos limiares de micção ( $\Delta I_{50}\%$  = -40,4%;  $\chi^2$  = 29,0; 1 g.l.;  $P < 0,0001$ ) (Fig.3). Não foram observadas diferenças significantes entre grupos para exoftalmia, defecação e salto.

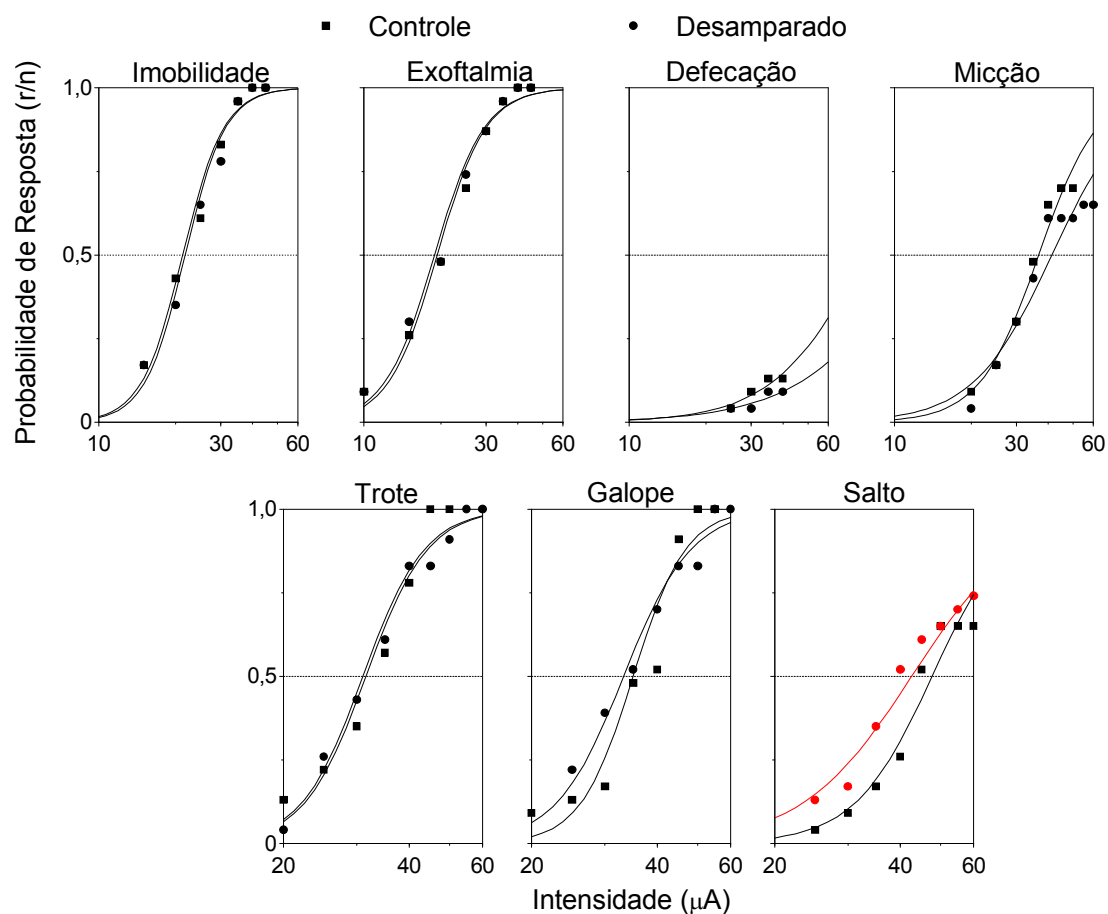


Figura 2. Limiares basais das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPD dos grupos CI (desamparo) e CE (controle). As curvas representam o ajuste logístico das freqüências acumuladas das respostas limiares.  $r$  -número de animais que apresentaram a resposta,  $n$  -número total de ratos estimulados. As linhas vermelhas indicam diferenças significantes em relação ao grupo CE ( $P < 0,05$ , teste do  $\chi^2$  da razão de verossimilhanças para a locação das curvas).



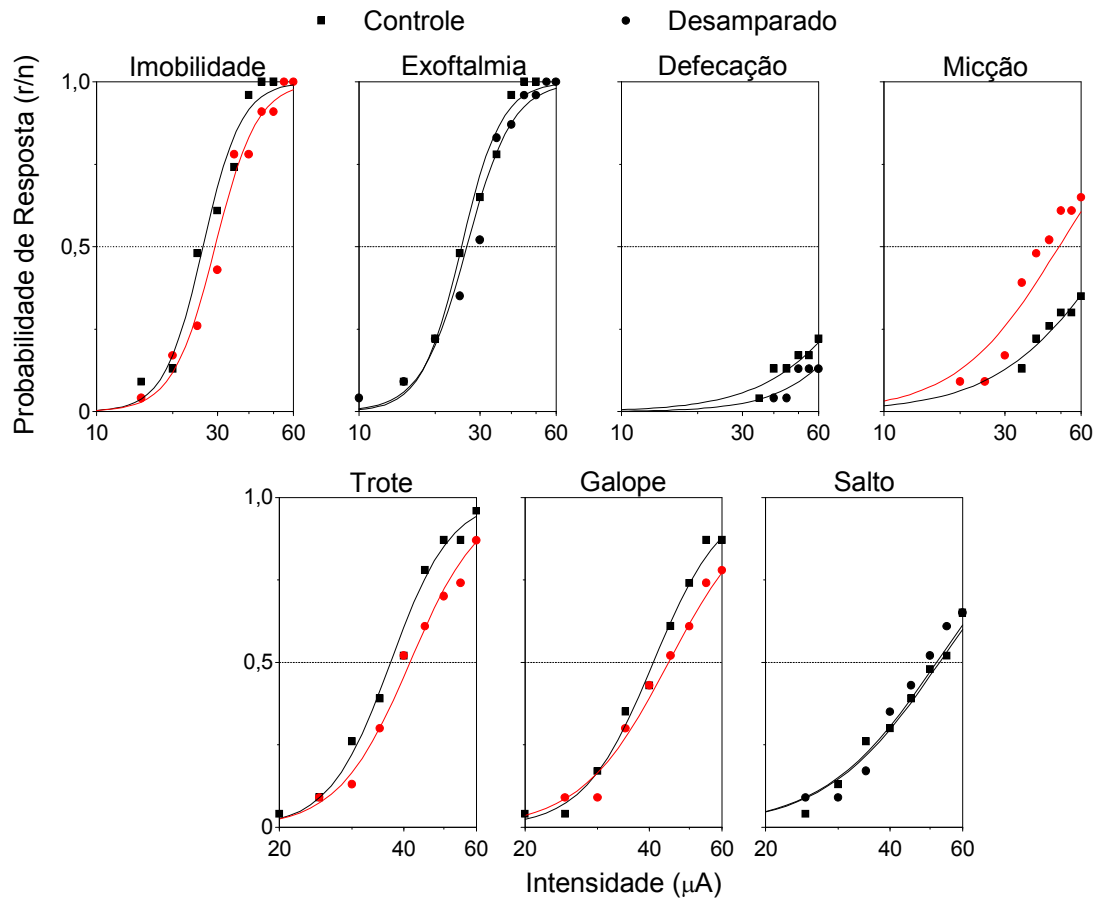


Figura 3. Limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPD dos grupos CI (desamparo) e CE (controle) 1 dia após a sessão-teste (demais detalhes como na Fig. 2).

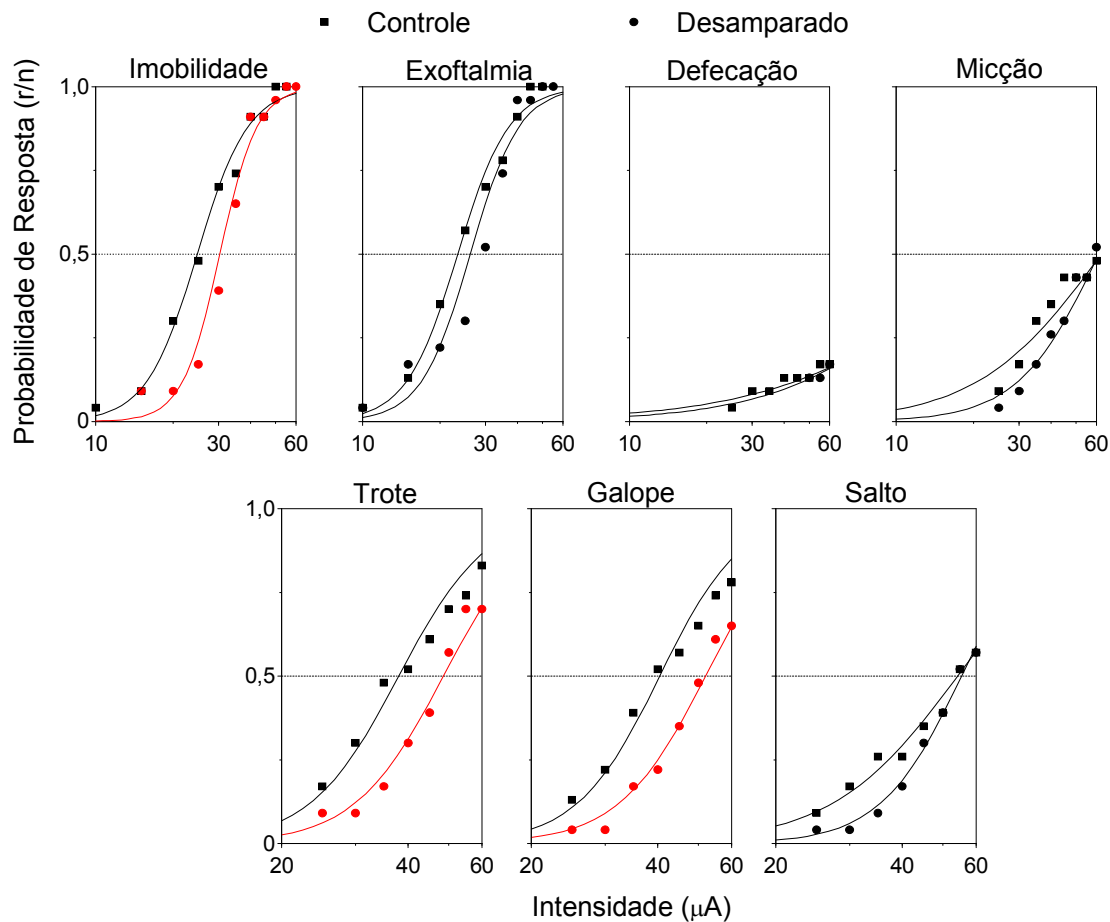


Figura 4. Limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPD dos grupos CI (desamparo) e CE (controle) 6 dias após a sessão-teste (demais detalhes como na Fig. 2).

Seis dias após a sessão-teste, os ratos submetidos ao CI apresentaram diferenças ainda mais acentuadas em relação aos limiares do grupo CE para as respostas de imobilidade ( $\Delta I_{50}\% = 22,4\%$ ;  $\chi^2 = 9,8$ ; 1 g.l.;  $P < 0,001$ ), trote ( $\Delta I_{50}\% = 27,7\%$ ;  $\chi^2 = 21,2$ ; 1 g.l.;  $P < 0,0001$ ) e galope ( $\Delta I_{50}\% = 28,6\%$ ;  $\chi^2 = 26,7$ ; 1 g.l.;  $P < 0,0001$ ). Em contraste, os limiares de exoftalmia apresentaram diferenças apenas marginais ( $\Delta I_{50}\% = 11,9\%$ ;  $\chi^2 = 2,9$ ; 1 g.l.;  $P < 0,08$ ) e não foram observadas diferenças significantes para os limiares de micção e defecação (Fig.4).

As variações percentuais da  $I_{50}$ , de ambos os grupos, em relação aos limiares basais, estão apresentadas na Fig.5. Note-se que, ao contrário das outras respostas, os limiares da defecação e micção foram maiores no grupo CE.

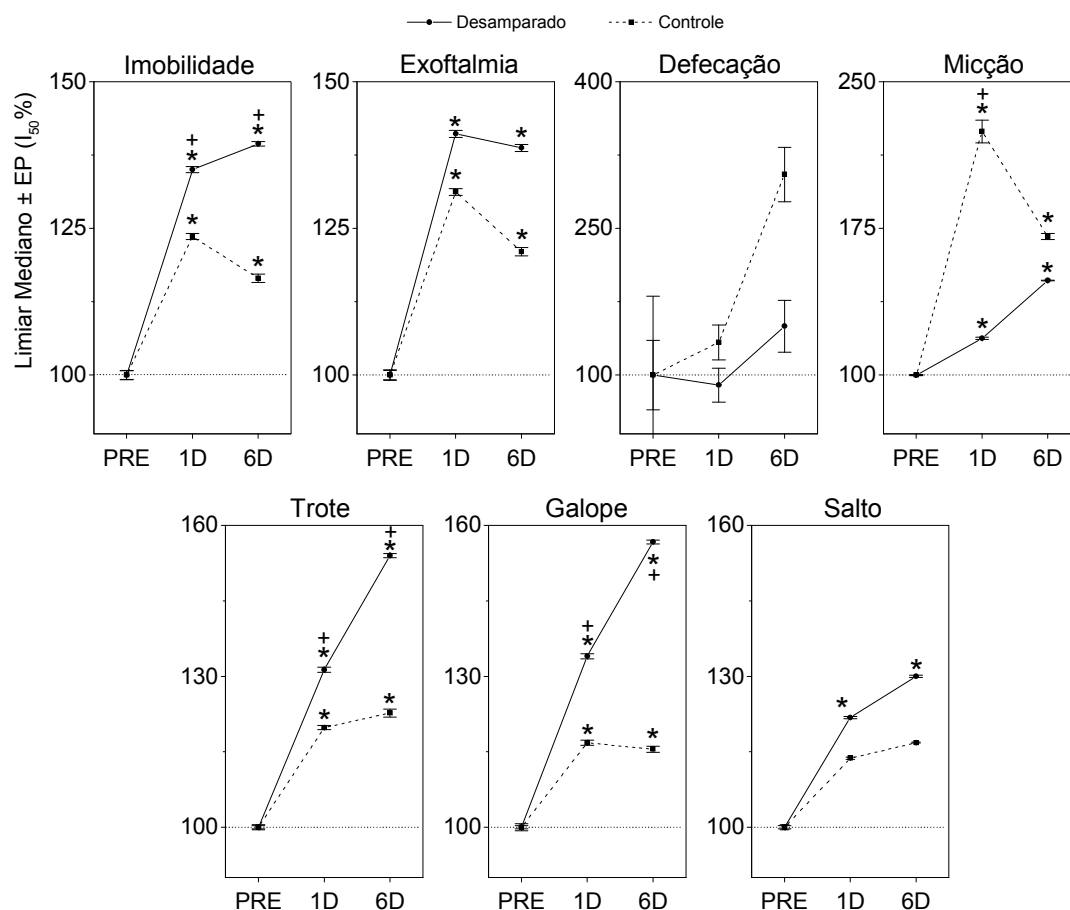


Figura 5. Variação percentual dos limiares medianos ( $I_{50}\%$ ) das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPD dos grupos CI (desamparo) e CE (controle). PRÉ – valores anteriores ao treinamento do desamparo, 1D – um dia após a sessão-teste, 6D – 6 dias após a sessão-teste. \* e +  $P < 0,05$ , diferenças significantes em relação à sessão anterior ao treino (PRÉ) e ao grupo controle, respectivamente (critério de Bonferroni do teste do  $\chi^2$  da razão de verossimilhanças para a locação das curvas).

Em 2 animais, os limiares da reação de defesa também foram determinados no 13º e 20º dias após a sessão-teste. Em particular, num animal

os limiares de galope foram progressivamente aumentados (em 50% e 137% no 1º e 6º dias pós-teste, respectivamente) até o bloqueio completo da resposta na sessão de estimulação do 13º dia. No outro animal, o galope foi abolido no 1º dia após a sessão-teste, retornando nas sessões do 13º e 20º dias, contudo, com limiares 100% e 70% acima dos valores basais, respectivamente.

*Efeitos do desamparo sobre a natação forçada.* O tempo de imobilidade na natação forçada dos ratos submetidos ao CI foi significativamente maior que aquele do grupo CE ( $129,1 \pm 6,7$  s *versus*  $107 \pm 9$  s, respectivamente,  $P < 0,03$ ).

*Efeitos do desamparo sobre a natação forçada.* O tempo de imobilidade na natação forçada dos ratos submetidos ao CI foi significativamente maior que aquele do grupo CE ( $129,1 \pm 6,7$  s *versus*  $107 \pm 9$  s, respectivamente,  $P < 0,03$ ).

Tabela 3. Efeitos do desamparo sobre o desempenho no LCE. TBA% e EBA% -porcentagens de tempo e entradas no braço aberto, respectivamente, EBF – número de entradas no braço fechado (média $\pm$ EPM).

Grupos	TBA%	EBA%	EBF
CI	$21,3 \pm 7,7$	$29,3 \pm 5,6$	$3,4 \pm 0,6$
CE	$7,9 \pm 2,5$	$18,6 \pm 4,5$	$4,2 \pm 0,6$

*Efeitos do desamparo sobre o desempenho no LCE.* Os ratos submetidos ao CI apresentaram aumentos marginais nas porcentagens de tempo ( $P < 0,06$ ) e do número de entradas ( $P < 0,07$ ) no braço aberto do LCE. Contudo, não houve

diferença alguma no número de entradas no braço fechado dos grupos CI e CE (Tabela 3).

*Efeito do desamparo sobre o peso corporal.* Os pesos corporais (média±DPA) dos grupos CI e CE foram idênticos no início do experimento (295±17 g e 295±14 g). Contudo, os ratos do grupo CI apresentaram pesos finais marginalmente superiores aos do grupo CE (361±27 g *versus* 295±14 g, respectivamente,  $P<0,10$ ).

## **DISCUSSÃO**

Comparados aos ratos do grupo CE, os ratos submetidos ao CI apresentaram déficits significativos de aprendizagem de uma nova tarefa de fuga -a fuga de 2 vias -confirmando o desenvolvimento do desamparo. De acordo com Seligman e colaboradores (1975), os déficits cognitivos e emocionais produzidos neste modelo são similares à depressão em humanos, uma vez que os animais “aprendem que as respostas ao CI são inúteis” (Seligman *et al.*, 1975). De fato, embora o labirinto aquático de Morris também seja baseado numa resposta de fuga, ratos previamente submetidos ao CI não apresentaram diferenças significantes de desempenho (Vollmayr *et al.*, 2004), mostrando que não há desenvolvimento de desamparo quando a fuga é viável. Contrariamente, a remoção da plataforma do labirinto de Morris produz respostas de imobilidade que foram atenuadas pelo tratamento subcrônico com desipramina (Schulz *et al.*, 2007; Huston *et al.*, 2009), tal como se observa no teste da natação forçada. No mesmo sentido, o grupo CI também apresentou tempos maiores de imobilidade no teste da natação forçada. Portanto, o déficit de aprendizagem da fuga de 2 vias e o aumento do tempo de imobilidade no teste da natação forçada sugerem o desenvolvimento efetivo do DA.

Por outro lado, a exposição a eventos estressantes resulta na intensificação de comportamentos relacionados à ansiedade (Grahn, 1995). Por exemplo, derrota em confrontos (*social defeat*) (Heinrichs *et al.*, 1992; Rodgers e Cole, 1993), estresse de natação (Britton *et al.*, 1992) e exposição ao odor de gato (Zangrossi e File, 1992) reduzem a exploração dos braços abertos do LCE, um modelo amplamente aceito de ansiedade generalizada.

Contudo, embora Steenbergen e colaboradores (1990) tenham relatado que a exposição prévia ao CI promove efeitos ansiogênicos no LCE,

estes resultados não foram replicados (Steenbergen *et al.*, 1991; Grahn *et al.*, 1995). Em particular, Grahn e colaboradores (1995) conduziram experimentos conjugados (*yoked*) mostrando que os efeitos dos choques no LCE não dependem da controlabilidade do estressor. No presente estudo, os ratos submetidos ao CI apresentaram aumentos apenas marginais do tempo e número de entradas nos braços abertos do LCE, mas não diferiram quanto à exploração dos braços fechados. Portanto, podemos afirmar com segurança que o CI não produziu efeitos ansiogênicos neste modelo.

Os limiares basais das respostas de defesa produzidas pela estimulação da MCPD dos grupos CE e CI foram virtualmente idênticos, reafirmando o critério de seleção dos ratos que apresentaram limiares de galope inferiores a 50  $\mu$ A. A única exceção foi a resposta de salto, cujos limiares foram ligeiramente inferiores no grupo CI. A homogeneidade dos grupos foi confirmada pela localização bastante similar dos sítios de estimulação, os quais situaram-se majoritariamente na coluna dorsolateral da MCPD.

Após a sessão-teste, os limiares das respostas de defesa foram aumentados em ambos os grupos. Não obstante, os aumentos dos limiares do grupo CI foram significativamente maiores que aqueles do grupo CE, principalmente, para as respostas de imobilidade, trote e galope. Por sua vez, os limiares de exoftalmia apresentaram aumentos apenas marginais em relação àqueles do grupo CE.

Contrariamente, os grupos CE e CI não diferiram quanto aos limiares de salto no 1º e 6º dias após a sessão-teste. A ausência de efeitos inibitórios do DA nos limiares de salto é, no entanto, aparente. De fato,



comparados aos valores basais, enquanto os limiares de salto do 6º dia pós-teste aumentaram apenas 17% no grupo CE, eles aumentaram 30% no grupo CI, corroborando o efeito atenuante do DA nesta resposta.

Por outro lado, os limiares de defecação e micção do grupo CI não diferiram ou foram até mesmo menores que aqueles do grupo CE, tal como ocorreu na resposta de micção no 1º dia pós-teste, mostrando mais uma vez que estas respostas não são componentes integrais da reação de defesa da MCPD (ver Estudo I).

O modelo de depressão por DA é usualmente criticado pela curta duração de seus efeitos. De fato, exceto pela depressão da corrida numa roda de atividade, a qual perdura por várias semanas (Maier *et al.*, 1990); os efeitos do DA dissipam-se 3 dias após a sessão-teste (Maier *et al.*, 1990; Maier, 2001; Hammack *et al.*, 2011). Contudo, os efeitos inibitórios sobre os limiares da reação de defesa puderam ser observados por até 20 dias em alguns animais, sugerindo que eles possam ser mais duradouros que o déficit de aprendizagem de fuga ou a facilitação do medo condicionado. No conjunto, nossos dados indicam que o DA produz aumentos duradouros dos limiares de todas as respostas de defesa da MCPD, exceto a defecação e a micção.

Assim como na depressão humana, o modelo de DA tem sido associado a alterações da função serotoninérgica. Em particular, Maier e colaboradores (1993) relataram que lesões eletrolíticas do NDR preveniram o déficit de aprendizado de fuga e a facilitação do medo condicionado no grupo exposto ao CI, mas não tiveram efeitos no grupo CE. Com base nesses dados, Maier e colaboradores (1993) sugeriram que as seqüelas da exposição ao CI devem-se à atividade excessiva do NDR durante o estresse inescapável. No

mesmo sentido, eles mostraram que a inibição do NDR pela microinjeção de 8-OH-DPAT (um agonista parcial do receptor 5-HT<sub>1A</sub>) preveniu as consequências do CI (Maier *et al.*, 1995). Surpreendentemente, no entanto, os estudos subsequentes deste grupo mostraram que os níveis de 5-HT da MCPD só foram aumentados nos ratos expostos ao CE (Amat *et al.*, 1998), sugerindo uma correlação positiva entre níveis de 5HT na MCPD e “controlabilidade” do estresse. Não obstante, estudos ainda mais recentes do mesmo grupo retomaram a hipótese original de que o CI promove a hiperativação do NDR e, podemos adicionar, o aumento da liberação de 5-HT na MCPD (Amat *et al.*, 2005, 2006, 2008; Baratta *et al.*, 2009; Maier and Watkins, 2010). Estes estudos também sugeriram que a ativação do NDR durante o CI seja mediada pelas áreas pré-límbica e infra-límbica do córtex prefrontal ventromedial. De fato, Floyd e colaboradores (2000) descreveram projeções abundantes das últimas áreas para as colunas ventrolateral e dorsolateral da MCPA. Embora o último estudo tenha sido dedicado às conexões das áreas prefronto-mediais e orbitofrontais com as colunas dorsolateral e ventrolateral da MCPA, os autores também verificaram densas projeções da área pré-límbica rostral para o NDR (ver Fig.9 de Floyd *et al.*, 2000). Embora os estudos acima sugiram a hiperatividade do NDR durante e após a aquisição do DA, deve ser notado que existem evidências indicando que tanto o aumento (Brown *et al.*, 1982; Edwards *et al.*, 1986) quanto a redução da 5-HT (Sherman e Petty, 1980; Petty e Sherman, 1983) sejam críticos, ou ainda, que a 5-HT não está sequer envolvida nos efeitos do DA (Anisman *et al.*, 1979; Hamilton *et al.*, 1986).

Graeff e colaboradores (Deakin e Graeff, 1991; Graeff, 2004) propuseram que os AP são inibidos pela neurotransmissão serotoninérgica na

MCPD. Esta hipótese é compatível com resultados anteriores mostrando que a administração crônica dos ISRS atenuam as respostas de defesa da MCPD (Vargas e Schenberg, 2001; Schenberg *et al.*, 2002). A hipótese de Deakin e Graeff (1991) também é consistente com o estudo original de Amat e colaboradores (1998), no qual os níveis de 5-HT da MCPD foram correlacionados à “controlabilidade” do estresse e, portanto, com o bloqueio das respostas de pânico. Contudo, embora os últimos resultados possam fornecer o fundamento da alta comorbidade dos AP com depressão e estresse pós-traumático, o presente estudo mostrou que os comportamentos de defesa da MCPD são fortemente inibidos no 1º e, principalmente, no 6º dia após a sessão-teste do DA. Não obstante, como os níveis aumentados de 5-HT no grupo CE foram observados durante a aquisição do DA (Amat *et al.*, 1998), os efeitos tardios do DA sobre os limiares da reação de defesa da MCPD podem envolver mecanismos diferentes, ou mesmo opostos, como um aumento tardio da atividade do NDR e da liberação de 5-HT na MCPD, ou outro mecanismo neuroquímico.

Alternativamente, se os comportamentos de defesa da MCPD são um modelo válido de AP, o presente estudo sugere que o DA não é equivalente nem à depressão maior nem ao estresse pós-traumático, condições associadas à facilitação dos AP. De fato, a curta duração dos efeitos do DA e a inibição dos comportamentos tipo-pânico da MCPD sugerem que o DA seja um modelo mais apropriado de reação aguda de estresse ou depressão reativa (distímia). Em todo caso, não deixa de ser memorável que o déficit da fuga na caixa de vaivém tenha sido acompanhado da inibição da fuga na natação forçada e da inibição da fuga pela estimulação da MCPD, sugerindo que a última estrutura

seja o substrato comum dos déficits de fuga dos animais submetidos ao estresse inescapável.

### **ESTUDO III:**

**EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA PARCIAL AO LONGO DA AMAMENTAÇÃO NOS COMPORTAMENTOS DE DEFESA INDUZIDOS PELA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL NA IDADE ADULTA.**

## **INTRODUÇÃO**

Vários estudos indicam a existência de uma forte correlação entre eventos traumáticos da infância e anormalidades comportamentais e neuroendócrinas na vida adulta (Kendler *et al.*, 1992; Furukawa *et al.*, 1999). Crianças que sofreram abusos físicos ou sexuais, ou que foram negligenciadas pelos pais, ou ainda, que vivenciaram experiências de divórcio ou privação dos cuidados maternos, podem tornar-se mais susceptíveis às psicopatologias (Bowby, 1973; Manicavasagar *et al.*, 1998; Rinne *et al.*, 2000; Heim e Nemeroff, 2001; Teicher *et al.*, 2003; Preter e Klein, 2008).

Experimentos com ratos recém nascidos mostram que o sistema nervoso é sensível a alterações ambientais. O desenvolvimento de respostas adaptativas ao estresse pode ser modificado por eventos que ocorreram período neonatal (Meaney *et al.*, 1993; Faure *et al.*, 2007). As evidências mostram que intervenções neste período alteram a relação mãe-filhote e que o comportamento da mãe tem efeitos no desenvolvimento do sistema nervoso do filhote (Cirulli *et al.*, 1994; Giovenardi *et al.*, 2000). Os estímulos tácteis, olfatórios e auditivos da mãe nos primeiros dias de vida são os estímulos mais importantes no desenvolvimento do sistema nervoso dos filhotes (Caldji *et al.*, 1998; Field *et al.*, 1988; Gunnar, 2003; Kuhn e Schanberg, 1998; Newport *et al.*, 2002).

No mesmo sentido, a teoria do apego de John Bowlby (1983) sugere que o relacionamento afetoso, íntimo e próximo, da mãe, ou figura-materna, na primeira infância (1 a 3 anos de idade) favorece o desenvolvimento de uma personalidade saudável. Ao contrário, a ausência do cuidado materno resultaria em ansiedade de separação da infância (*childhood separation anxiety*), levando ao desenvolvimento de apego ansioso (*anxious attachment*) e

“personalidade insegura” no adulto (Ainsworth e Bowlby, 1991; Bowlby, 1983; Bretherton, 1992), os quais seriam fatores predisponentes de fobia, pânico e depressão (Klein, 1983b).

A ansiedade de separação da infância (ASI) é um transtorno no qual a separação da criança da figura de apego, geralmente a mãe, é acompanhada de ansiedade excessiva (DSM IV-TR- APA, 2000). Klein (1980, 1995) descreve a ASI como um conjunto de sintomas e comportamentos de ansiedade que refletem a ativação de um sistema de alarme neurofisiológico que protege o jovem de rupturas reais, ou potenciais, dos laços familiares.

Embora a etiologia dos transtornos da ansiedade e, em particular, do transtorno do pânico (TP), seja complexa e envolva a interação de fatores biológicos e ambientais (Klauke *et al.* 2010), a ASI parece predispor os indivíduos ao TP e à agorafobia subsequente (Klein e Fink, 1962; Mattis e Ollendick, 1997; Preter e Klein, 2008). De fato, segundo Preter e Klein (2008), o aumento da frequência de TP na idade adulta foi o único achado significativo no único estudo controlado de *follow-up* com entrevistas clínicas de crianças com ASI e fobia escolar. O TP é uma doença crônica que acarreta um prejuízo acentuado do desempenho social dos pacientes, limitando suas atividades sociais e profissionais de forma completa ou parcial, principalmente, se for acompanhado de agorafobia (Candilis *et al.*, 1999, Mendlowicz e Stein, 2000). De acordo com Candilis e colaboradores (1999), o prejuízo da qualidade de vida dos pacientes com TP é similar ao dos pacientes com depressão maior. O TP apresenta uma prevalência estimada entre 1% e 3% da população (Brown and Barlow, 1992; Frank *et al.*, 2002; Kaufman and Charney, 2000), sendo 2 a 4 vezes mais freqüente em mulheres (Eaton *et al.*, 1994, Joyce *et al.*, 1989).



Clinicamente, o TP consiste numa síndrome de ansiedade que foi reconhecida como entidade nosológica a partir de 1980 (APA, 1980). O sintoma central desta condição é o ataque espontâneo de pânico (AP), que pode ocorrer várias vezes ao dia ou somente algumas vezes ao ano (Mezzasalma *et al.*, 2004). Os AP são definidos no DSM-IV como um período discreto de desconforto ou medo intensos, acompanhados por pelo menos 4 dos seguintes sintomas: palpitações, tremores, suores, aumento da frequência respiratória, sensação de sufocamento, medo de morrer e medo de perder a razão. Contudo, Klein (1993b) sugere que o AP seja caracterizado por uma dispnéia repentina seguida de hiperventilação, pânico e desejo de fuga.

Por outro lado, a estimulação elétrica ou química da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) produz comportamentos defensivos que têm sido propostos como um modelo de AP (Gentil, 1988; Jenck *et al.*, 1995; Deakin and Graeff, 1991; Schenberg *et al.*, 2001). Enquanto a estimulação da MCPD com intensidades baixas produz a “reação de congelamento” (exoftalmia e imobilidade tensa), as intensidades mais elevadas desencadeiam respostas de fuga (trotes, galopes e saltos). Embora com menor frequência, as respostas de micção e defecação também são observadas (Schenberg *et al.*, 1993; Bittencourt *et al.*, 2004). Estudos farmacológicos anteriores, mostraram que a resposta de galope parece ser o melhor representante dos AP, uma vez que foi seletiva e acentuadamente atenuada por inibidores da recaptação de serotonina (5-HT) (clomipramina e fluoxetina) administrados em doses e regimes similares aos da terapia do TP (Schenberg *et al.*, 2001; 2002; Vargas e Schenberg, 2001). Em humanos, estudos conduzidos por Nashold e colaboradores (1969), mostraram que a estimulação elétrica da MCPD de

voluntários sadios provoca reações emocionais de ansiedade, terror, sudorese, tremores e sensação de morte iminente, dentre outros sintomas associados aos AP.

Embora os últimos resultados sejam indícios convincentes do envolvimento da MCPD nos AP, as causas da ocorrência espontânea destes ataques permanecem obscuras. Não obstante, as evidências mencionadas sugerem que o TP esteja relacionado à ASI. Portanto, o presente estudo examinou os efeitos da privação materna parcial (3 h) durante o período de amamentação nos limiares das respostas de defesa produzidas pela estimulação elétrica da MCPD na vida adulta.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## **ANIMAIS**

Ratas Wistar prenhas, primíparas, fornecidas pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas foram mantidas numa sala com temperatura controlada de aproximadamente 23 °C e ciclo claro-escuro (12 X 12 h, luzes acesas às 6:00 h). As ratas foram alojadas individualmente em gaiolas de polietileno medindo 49 cm x 34 cm x 16 cm (caixa ninho), com água e comida à vontade. No 1º dia pós-natal (P1) foi feita a sexagem para a padronização das ninhadas (máximo de 8 animais), permanecendo somente os machos com suas respectivas mães até o desmame (P21). Os procedimentos foram aprovados e realizados de acordo com o comitê de ética no uso de animais desta Universidade (CEUA-UFES).

## **PROCEDIMENTOS**

Neste estudo foram utilizados 69 animais, dos quais 39 foram submetidos à privação materna (P) e 30 permaneceram com as mães (NP), de P2 até P21. Em P60, os animais foram submetidos à cirurgia de implantação de eletrodo na MCPD. Os ratos foram estimulados eletricamente e submetidos aos testes de labirinto-em-cruz elevado (LCE) e natação forçada (NF) em P65, P66 e P67, respectivamente (Tabela 1). Os pesos corporais foram registrados em P60. Por fim, os ratos foram sacrificados e os cérebros processados para a análise histológica.

Tabela 1. LCE -labirinto-em-cruz elevado, NF -natação forçada, S -sacrifício.

P1	P2-P21	P60	P65	P66	P67	P68
Sexagem	Privação Materna	Cirurgia e Pesagem	EIC	LCE	NF	S

Os procedimentos de confecção de eletrodos, neurocirurgia, estimulação intracraniana, testes de NF e LCE, perfusão, histologia e análise estatística foram descritos nos Estudos I e II.

#### *Privação materna*

Em P2 os filhotes eram marcados no dorso com uma caneta dermatográfica (Texta Fineline 700) para a distinção dos grupos P e NP. Durante procedimento de privação materna, os ratos P eram acomodados individualmente em caixas de separação (30 cm x 20 cm x 13 cm) e os ratos NP eram transportados com a mãe para uma nova caixa ninho, doravante chamada caixa controle. Adicionalmente, o cheiro e a comunicação com a mãe eram atenuados colocando-se as caixas de separação num compartimento fechado (49 cm x 66 cm x 96 cm) com uma pequena abertura para ventilação (10 cm x 10 cm).

A privação materna foi realizada pela separação dos filhotes por 3 horas, entre 7:30 h e 11:30 h, de P2 a P21. Ao término das sessões de privação, os animais retornavam para a caixa ninho. O grupo NP foi manipulado de forma similar durante o transporte com as mães para a caixa

controle e o retorno para a caixa ninho. Após o desmame, os ratos P e NP eram alojados em suas respectivas gaiolas, em grupos de 2 a 4 animais, com água e comida *ad libitum*. Os animais eram manipulados por um único pesquisador que também realizava a limpeza das caixas a cada 5 dias.

## **RESULTADOS**

*Sítios estimulados.* A localização dos eletrodos nos grupos privado e não-privado foi bastante similar. Assim, com exceção de 3 eletrodos (11%) situados nas camadas profundas do colículo superior do grupo privado, os demais localizaram-se nas colunas dorsolateral (P – 61%, NP -74%) e lateral (P – 28%, NP -26%) da MCPA. Os eletrodos da coluna lateral de ambos os grupos localizaram-se nas áreas mais caudais da MCPA (-7,8 a -8,3 mm posteriores ao bregma).

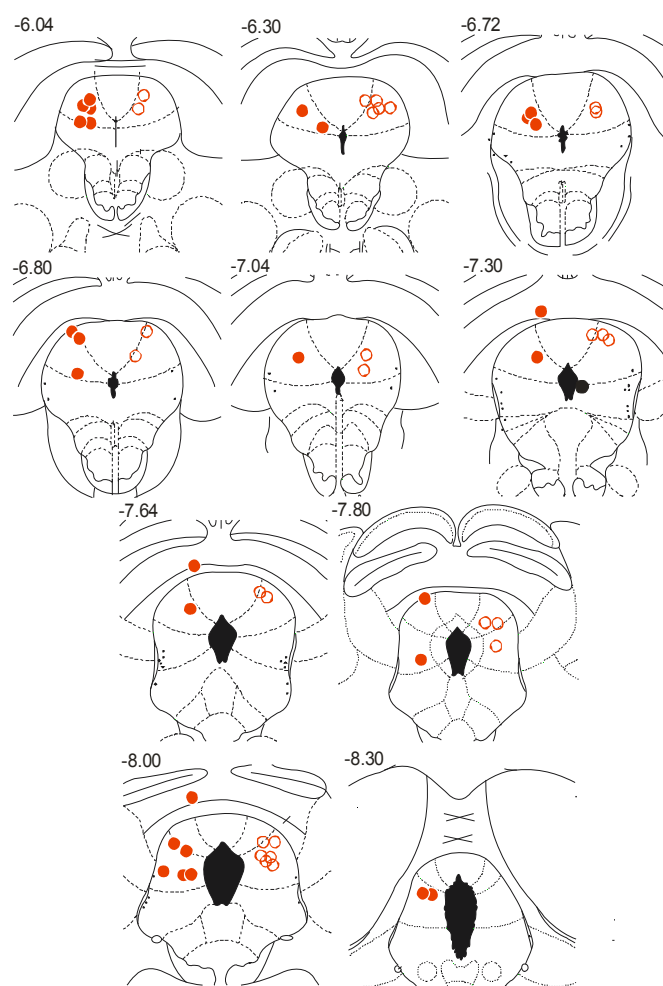


Figura 1. Sítios estimulados nos ratos submetidos à privação materna (círculos cheios) e controles não-privados (círculos vazios). Embora todos os eletrodos tenham sido implantados no lado direito do cérebro, eles foram representados em lados distintos para melhor visualização. Os números representam as coordenadas ântero-posteriores em relação ao bregma de cortes coronais do atlas do cérebro do rato de Paxinos e Watson (1998).



*Efeitos da privação materna sobre os limiares das respostas defensivas produzidas por estimulação da MCPD.* A privação materna causou uma redução significativa dos limiares de imobilidade ( $\Delta I_{50}\% = -20\%$ ;  $\chi^2=22,7$ ; 1 g.l.;  $P<0,0001$ ), exoftalmia ( $\Delta I_{50}\% = -28\%$ ;  $\chi^2=19,3$ ; 1 g.l.;  $P<0,0001$ ), trote ( $\Delta I_{50}\% = -17\%$ ;  $\chi^2=20,6$ ; 1 g.l.;  $P<0,0001$ ), galope ( $\Delta I_{50}\% = -20\%$ ;  $\chi^2=33,6$ ; 1 g.l.;  $P<0,0001$ ), salto ( $\Delta I_{50}\% = -13\%$ ;  $\chi^2=7,7$ ; 1 g.l.;  $P<0,005$ ). Não foram observados efeitos significantes para as respostas de defecação e micção.

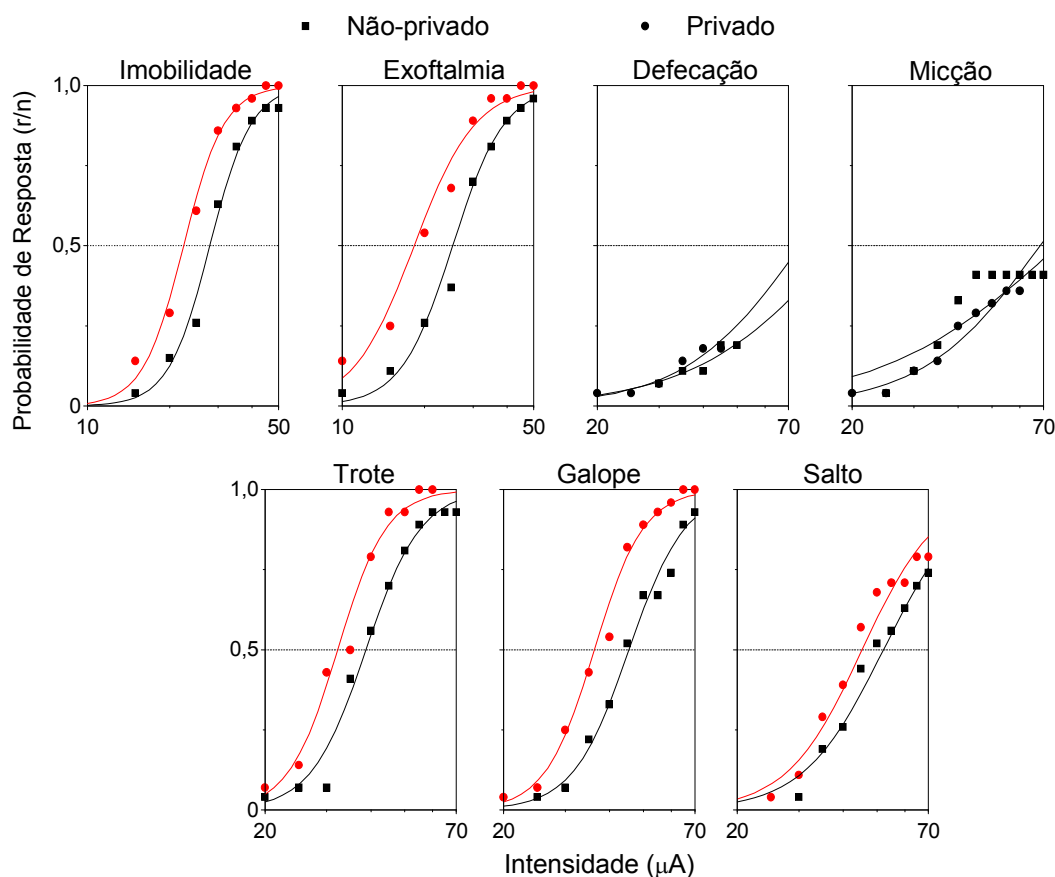


Figura 2. Efeitos da privação materna sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPD. As curvas representam o ajuste logístico das frequências acumuladas das respostas limiares. r -número de animais que apresentaram a resposta, n -número total de ratos estimulados. As linhas vermelhas indicam diferenças significantes em relação ao grupo NP ( $P<0,05$ , teste do  $\chi^2$  da razão de verossimilhanças para a locação das curvas).

*Efeitos da privação materna sobre a natação forçada.* O tempo de imobilidade na natação forçada foi virtualmente idêntico para os grupos privado ( $87 \pm 12$  s) e não-privado ( $93 \pm 12$  s).

*Efeitos da privação materna sobre o desempenho no LCE.* Não houve diferenças significantes entre grupos privado e não-privado para nenhuma variável do LCE (Tabela 2).

Tabela 2. Efeitos da privação materna sobre o desempenho no LCE. TBA% e EBA% -porcentagens respectivas de tempo e entradas no braço aberto, EBF – número de entradas no braço fechado (média $\pm$ EPM).

Grupos	TBA%	EBA%	EBF
Privado	$22,8 \pm 4,7$	$28,3 \pm 4,25$	$4,7 \pm 0,5$
Não-privado	$18,6 \pm 3,7$	$27,8 \pm 4,5$	$3,9 \pm 0,4$

*Efeito da privação materna sobre o peso corporal.* Em P60, não houve diferença significativa no peso corporal dos ratos privados ( $344 \pm 35$  g) e não-privados ( $350 \pm 39$  g) (média $\pm$ DPA).

## **DISCUSSÃO**

Existem evidências de que a privação materna diária de ratos recém-nascidos, por cerca de 3 horas, ao longo das 2 primeiras semanas de vida produz comportamentos de ansiedade e depressão na idade adulta (Plotsky e Meaney, 1993; Huot *et al.*, 2001; Meaney, 2001; Pryce e Felden, 2003; El Khoury *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Aisa *et al.*, 2008; Marais *et al.*, 2008; Lambás-Senas *et al.*, 2009). Contudo, no presente estudo não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos P e NP em nenhuma das variáveis relacionadas à ansiedade ou depressão, tanto no LCE quanto na NF, corroborando observações similares de outros autores (Lehmann e Feldon 2000; Shalev e Kafkafi, 2002). Os resultados inconsistentes da literatura podem ter sido devidos às diferenças procedurais. De fato, enquanto períodos curtos (3-15 min) de separação materna reduziram as respostas comportamentais e endócrinas aos estressores na idade adulta (Meaney *et al.*, 1992; 1996), períodos prolongados (3-6 h) aumentaram estas respostas (Plotsky e Meaney, 1993; Van Oers *et al.*, 1998; Francis e Meaney, 1999). Além do tempo de contacto entre mãe e filhote (Meaney, 2001), existem outros fatores que podem influir nos resultados. Por exemplo, Hofer (1996) relatou que dentre inúmeras variáveis que foram combinadas em complexidade crescente (textura, temperatura dos filhotes, do ambiente ou da mãe, propriedades de objeto substitutivo da mãe, etc), um pequeno “tapete” de pêlo sintético foi a única variável que, isoladamente, reduziu a vocalização dos filhotes privados (Hofer, 1996). Por outro lado, embora a teoria do apego (Bowlby, 1983) postule que as respostas comportamentais e endócrinas à separação materna sejam controladas por um mecanismo unitário, Levine e colaboradores (Levine *et al.*, 1985; Bayart *et al.*, 1990) mostraram que os filhotes de macacos vocalizam

mais quando mantêm contato visual com a mãe, mas têm respostas endócrinas mais acentuadas no isolamento completo. Assim, embora os filhotes separados não tenham tido contato visual com a mãe, a influência da comunicação ultrasônica entre mãe e filhote não pode ser descartada uma vez que os animais permaneceram na mesma sala.

Por outro lado, é importante notar que a privação materna por 3 h diárias não foi um “estresse alimentar” suficientemente severo a ponto de gerar um distúrbio nutricional. Assim, embora o peso dos animais não tenha sido acompanhado ao longo do experimento e, em particular, durante o período de privação, os pesos finais dos grupos P e NP foram virtualmente idênticos.

Notavelmente, no entanto, os ratos privados apresentaram reduções acentuadas dos limiares dos comportamentos de defesa de imobilidade, exoftalmia, trote, galope e salto. Contudo, as respostas de micção e defecação não foram facilitadas, sugerindo, mais uma vez, que estas baseiam-se em mecanismos neurais distintos da exoftalmia e respostas somáticas de defesa (ver Estudo I). De fato, urgências de micção e defecação não são sintomas clínicos dos ataques de pânico (APA, 2000). Em todo caso, como os sítios de estimulação dos ratos P e NP foram bastante similares, as diferenças de limiares dos mesmos não podem ser atribuídas à localização dos eletrodos, os quais situaram-se majoritariamente nas colunas dorsolateral e lateral da MCPD. Adicionalmente, estudos anteriores mostraram que as últimas colunas são indistinguíveis do ponto de vista dos limiares das respostas de defesa eliciadas por estimulação elétrica senoidal (Bittencourt *et al.*, 2004). Assim, a redução dos limiares deve ser atribuída ao procedimento específico de privação materna.

Dados clínicos sugerem que a ASI pode estar relacionada a um aumento do risco de desenvolvimento de vários transtornos psiquiátricos na idade adulta, tais como fobia social, depressão maior e TP, com e sem agorafobia (Breier *et al.*, 1986; Deltito *et al.*, 1986; Blandin *et al.*, 1994; Lipsitz *et al.*, 1994; Mattis e Ollendick, 1997). Dentre estas, merece destaque a maior incidência de TP em adultos que sofreram ASI. Assim, Souza (1996) relatou que de 68 pacientes com TP, 32% preencheram os critérios para o diagnóstico de ansiedade de separação na infância ou adolescência. Gittelman e Klein (1985) também observaram que uma taxa elevada de pacientes adultos com TP apresentou ASI e fobia escolar (*school refusal*) na sua juventude. Estes autores também propuseram que a ASI é um precursor tanto do TP quanto agorafobia (Klein 1980; Gittelman e Klein 1985). Contudo, Silove e colaboradores (1996) concluíram que a maior parte das evidências relacionam ASI preferencialmente ao pânico, mas não à agorafobia. Estes autores também ressaltaram que a relação da ASI com outros transtornos de ansiedade e depressão permanece obscura. Por fim, Gutierrez (1996) sugeriu que a reação das crianças com ASI quando são separadas de seus pais é indistingüível de um ataque de pânico.

Klein e Fink (1962) propuseram uma patofisiologia de desenvolvimento individual que relaciona ASI com TP e agorafobia na vida adulta, uma vez que 50% dos pacientes agorafóbicos relataram ASI severa que muitas vezes impediu o comparecimento à escola. De fato, Kagan e colaboradores (1988) observaram que ao longo da vida dos pacientes com TP desenvolvem-se, primeiro, a ASI, seguida de fobia social na adolescência e TP na idade adulta. A eficácia do panicolítico imipramina na terapia da ASI

confirmou estas proposições (Bernstein *et al.*, 2000; Gittelman-Klein and Klein, 1973). Estas observações, juntamente com a teoria de apego e abordagens etológicas de ansiedade (Bowlby, 1983), impulsionaram o desenvolvimento da classificação contemporânea dos transtornos de ansiedade.

A ansiedade de separação também parece estar relacionada ao estresse familiar e início precoce do TP (Battaglia *et al.*, 1995). Pacientes comórbidos para vários transtornos de ansiedade também fazem relatos freqüentes de ASI (Lipsitz *et al.*, 1994). Contudo, as afirmações de que a ASI predispõe vários transtornos de ansiedade com a mesma probabilidade (Van der Molen *et al.*, 1989) pode ser devida a um diagnóstico ambíguo de ataques de pânico com sintomas limitados ou à inconsistência dos métodos de entrevista (Preter e Klein, 2008). Não obstante, o aumento da incidência TP foi o único achado significativo no único estudo controlado de longo prazo, duplo-cego, com entrevistas clínicas de crianças com ASI e fobia escolar (Klein, 1995). O início dos ataques de pânico também é freqüentemente precipitado pela separação, perda social ou luto (Klein e Fink, 1962; Faravelli and Pallanti, 1989; Kaunonen *et al.*, 2000; Klein, 1993b; Milrod *et al.*, 2004).

Por outro lado, Pine e colaboradores (2000; 2005) observaram uma relação entre a desregulação respiratória e os transtornos de ansiedade na infância. A hipersensibilidade respiratória à inalação de uma mistura de 5% de CO<sub>2</sub> foi significativamente maior nas crianças com ASI e, em menor grau, TAG, que naquelas com fobia social. Estes dados estão de acordo com a hipótese ampliada do alarme falso de sufocamento (Preter e Klein, 2008; Preter *et al.*, 2011), na qual o TP e a ASI estão relacionados a uma anormalidade dos

mecanismos opióides que regularia tanto os mecanismos respiratórios quanto as relações parentais, respectivamente.

De fato, Genest e colaboradores (2003, 2007a) mostraram que ratos machos adultos (mas não fêmeas) que foram submetidos à privação materna na infância apresentam respostas ventilatórias à hipóxia 23% maiores que as dos controles não privados. Contrariamente, as respostas ventilatórias à hipercapnia (CO<sub>2</sub> 5%) foram 47% menores nos ratos machos privados, mas 63% maiores nas fêmeas (Genest *et al.*, 2007b). Estudos recentes do nosso laboratório (Schimitel *et al.*, 2011) mostraram que a hipóxia citotóxica por doses subletais de cianeto de potássio (KCN) produz comportamentos de defesa similares aos da estimulação da MCPD. Adicionalmente, o KCN potenciou as respostas de defesa à estimulação elétrica da MCPD e, vice-versa, a lesão da última estrutura aboliu as respostas de defesa à administração isolada do KCN. No mesmo sentido dos estudos de Genest e colaboradores (2003, 2007a), as respostas de defesa dos ratos machos à estimulação da MCPD só foram facilitadas pela hipóxia (KCN), sendo atenuadas pela hipercapnia. Não obstante, a hipercapnia potenciou as respostas de defesa à administração de KCN, sugerindo que o mecanismo fundamental do alarme de sufocamento nos ratos machos esteja relacionado à hipóxia. Assim, como os pacientes de pânico têm sensibilidade aumentada ao CO<sub>2</sub> e as mulheres apresentam frequência aumentada de TP, os resultados acima e os do presente estudo corroboram a hipótese de uma fisiopatologia do desenvolvimento que envolve ansiedade de separação e alarmes falsos de sufocamento (Klein, 1993b; Preter e Klein, 2008).



Portanto, se a privação materna e a estimulação elétrica da MCPD forem modelos consistentes de ASI e TP, nossos dados indicam que a ASI é um fator predisponente do TP, mas não do TAG ou depressão. Em realidade, os resultados do presente estudo foram opostos aos observados no modelo de depressão reativa (ver Estudo II), no qual as respostas à estimulação da MCPD foram fortemente atenuadas por períodos de até 20 dias após a aquisição do comportamento de desamparo. As alterações neurobiológicas do presente estudo foram ainda mais persistentes e, possivelmente, permanentes, uma vez que foram observadas 45 dias após o período de privação materna. De fato, vários estudos sugerem que os sintomas da ASI persistem em adultos (Gittleman e Klein, 1984; Manicavasagar *et al.*, 2000, 2001; 2003; Annicchino e Matos, 2007). Assim, a despeito de relatos inconsistentes da clínica (Doerfler *et al.*, 2007), os resultados do presente estudo fornecem uma base biológica da alta comorbidade da ASI e TP.

## CONCLUSÕES

1. A inibição da resposta de fuga dos ratos submetidos aos choques inescapáveis foi transferida para as fugas do teste da natação forçada e da estimulação elétrica da MCPD, sugerindo que a última estrutura seja o substrato comum dos comportamentos de fuga dos primeiros procedimentos.
2. Nenhum dos modelos apresentou efeitos consistentes de aumento da ansiedade, descartando sua utilização como modelo adequado de TAG.
3. Enquanto os efeitos pró-depressivos da bulbectomia olfatória e DA foram corroborados no teste da natação forçada, eles não o foram para a privação materna, sugerindo que esta seja um modelo mais apropriado de vulnerabilidade a transtornos psiquiátricos do que de ansiedade ou depressão propriamente ditos.
4. O DA inibiu os comportamentos de defesa produzidos pela estimulação elétrica da MCPD, sugerindo que este difere dos quadros de depressão maior usualmente associados ao TP.
5. A bulbectomia olfatória e a ASI facilitaram os comportamentos de defesa produzidos pela estimulação da MCPD, reproduzindo os dados clínicos de alta comorbidade da depressão e ASI com o TP.

## **REFERÊNCIAS**

- Ainsworth MDS and Bowlby J (1991). An ethological approach to personality development. *Am Psychol* 46: 331-341.
- Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Rio J, Ramirez MJ (2008). Effects of maternal separation on hypothalamic-pituitary-adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats. *Neuroscience* 154: 1218-1226.
- Alfonso J, Frasch AC, Flugge G (2005). Chronic stress, depression and antidepressants: effects on gene transcription in the hippocampus. *Rev Neurosci* 16: 43-56.
- Amat J, Matus-Amat P, Watkins LR, Maier SF (1998). Escapable and inescapable stress differentially and selectively alter extracellular levels of 5-HT in the ventral hippocampus and dorsal periaqueductal gray of the rat. *Brain Res* 797: 12-22.
- Amat J, Baratta MV, Paul E, Bland ST, Watkins LR, Maier SF (2005). Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nat Neurosci* 8: 365-371.
- Amat J, Paul E, Zarza C, Watkins LR, Maier SF (2006). Previous experience with behavioral control over stress blocks the behavioral and dorsal raphe nucleus activating effects of later uncontrollable stress: role of the ventral medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 26: 13264-13272.
- Amat J, Paul E, Watkins LR, Maier SF (2008). Activation of the ventral medial prefrontal cortex during an uncontrollable stressor reproduces both the immediate and long-term protective effects of behavioral control. *Neuroscience* 154: 1178-1186.

- Angst J and Wick W (1993). The epidemiology of frequent and less frequent panic attacks. In: SA Montgomery (Ed.). *Psychopharmacology of Panic*. New York: Oxford University Press, p. 7-24.
- Anisman H, Irwin J, Sklar, LS (1979). Deficits in escape performance following catecholamine depletion: Implications for behavioral deficits induced by uncontrollable stress. *Psychopharmacology* 61: 107-124.
- Annicchino AGPS and Matos EV (2007). Separation anxiety in adults with panic disorder: a cognitive-behavior treatment *Estudos de Psicologia*, Campinas, 24: 33-39.
- APA (1980). *DSM-III: Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders of American Psychiatric Association, Third Edition*, American Psychiatric Press Washington, DC.
- APA (1994). *DSM-IV: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders of American Psychiatric Association, Fourth Edition*, American Psychiatric Press Washington, DC.
- APA (2000). *DSM-IV-TR: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders of American Psychiatric Association, Fourth Edition*, American Psychiatric Press Washington, DC.
- Austin MP, Mitchell P, Goodwin GM (2001). Functional neuropathology cognitive deficits in depression: possible implications for the Brit J Psychiat 178: 200-206.
- Ballenger JC (1998). Comorbidity of panic and depression: implications for clinical management. *Int Clin Psychopharmacol* 13: S13-S17.

- Baratta MV, Zarza CM, Gomez DM, Campeau S, Watkins LR, Maier SF (2009). Selective activation of dorsal raphe nucleus-projecting neurons in the ventral medial prefrontal cortex by controllable stress. *Eur J Neurosci* 30: 1111-1116.
- Battaglia M, Bertella S, Politi E, Bernardeschi L, Perna G, Gabriele A, Bellodi L (1995). Age at onset of panic disorder: influence of familial liability to the disease and of childhood separation anxiety disorder. *Am J Psychiatry* 152: 1362-1364.
- Bayart F, Hayashi KT, Faull KF, Barchas JD, Levine S (1990). Influence of maternal proximity on behavioral and physiological responses to separation in infant rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Behav Neurosci* 104: 98-107.
- Bernstein GA, Borchardt CM, Perwien AR, Crosby RD, Kushner MG, Thuras PD, Last CG (2000). Imipramine plus cognitive-behavioral therapy in the treatment of school refusal. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 39: 276-283.
- Bertoglio LJ, Carobrez AP (2004). Scopolamine given pre-Trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze Trial 2. *Behav Pharmacol* 15: 45-54.
- Bertoglio LJ, de Bortoli V, Zangrossi HJr (2007). Cholecystokinin- 2 receptors modulate freezing and escape behaviors evoked by the electrical stimulation of the rat dorsolateral periaqueductal gray. *Brain Res* 1156: 133-138.

- Biederman J, Petty C, Faraone SV, Hirshfeld-Becker D, Pollack MH, Henin A, Gilbert J, Rosenbaum JF (2004). Moderating effects of major depression on patterns of comorbidity in patients with panic disorder. *Psychiatry Research* 126: 143-149.
- Bittencourt AS, Carobrez AP, Zamprogno LP, Tufik S, Schenberg LC (2004). Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. *Neuroscience* 125: 71-89.
- Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ (2003). The mouse defense test battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Eur J Pharmacol* 463: 97-116.
- Blandin N, Parquet PJ, Bailly D (1994). Separation anxiety. Theoretical considerations. *Encephale* 20: 121-129.
- Blok BFM, Willemsen ATM, Holstege G (1997). A PET study on brain control of micturition in humans. *Brain* 120: 111-121.
- Blok BFM, Sturms LM, Holstege G (1998). Brain activation during micturition in women. *Brain* 121: 2033-2042.
- Blumberg MS and Alberts JR (1990). Ultrasonic vocalizations by rat pups in the cold: an acoustic by-product of laryngeal braking? *Neurosci Behav* 5: 808-817.
- Borsini F and Meli A (1988). Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology* 94: 147-61.

- Bougarel L, Guitton J, Zimmer L, Vaugeois JM, El Yacoubi M (2011). Behaviour of a genetic mouse model of depression in the learned helplessness paradigm. *Psychopharmacology* 1-11.
- Bourin M, Fiocco AJ, Clenet F (2001). How valuable are animal models in defining antidepressant activity? *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 16: 9-21.
- Bowlby J (1983). *Attachment and Loss*. 2nd Edition, New York: Basic Books.
- Bradwejn J, Koszycki D, Payeur R, Bourin M (1993). Cholecystokinin and panic disorders. In: SA Montgomery (Ed.). *Psychopharmacology of Panic*. New York: Oxford University Press, p. 110-117.
- Breier A, Charney DS, Heninger GR (1986). Agoraphobia with panic attacks. Development, diagnostic stability, and course of illness. *Arch Gen Psychiatry* 43: 1029-1036.
- Bretherton I (1992). The origins of attachment theory: John Bowlby and Mary Ainsworth. *Dev Psychol* 28: 759-775.
- Britton KT, McLeod S, Koob GF, Hauger R (1992). Pregnenolone attenuates anxiogenic behavioral effects of corticotropin releasing factor and stress. *Pharmacol Biochem Behav* 41: 399-403.
- Broadhurst PL (1960a). Application of biometrical genetics to the inheritance of behaviour. In: HJ Eysenck (Ed.). *Experiments in personality*, vol. 1, London: Routledge & Keegan P, p. 3-102.
- Broadhurst PL (1960b). Abnormal animal behavior. In: HJ Eysenck (Ed.) *Handbook of Abnormal Behaviour*, London: Pitman, p. 726-763.



- Broadhurst P L (1975). The Maudsley reactive and nonreactive strains of rats, a survey. *Behav Genet* 5: 299-319.
- Brown TA and Barlow DH (1992). Comorbidity among anxiety disorders: implications for treatment and DSM-IV. *J Consult Clin Psychol* 60: 835-844.
- Brown LR, Rosellini A, Samuels OB, Riley EP (1982). Evidence for a serotonergic mechanism of the learned helplessness phenomenon. *Pharmacol Biochem Behav* 17: 877-883.
- Brunello N, den Boe JA, Judd LL, Kasper S, Kelsey JE, Lader M, Lecrubier Y, Lepine JP, Lydiard RB, Mendlewicz J, Montgomery SA, Racagni G, Stein MB, Wittchen HU (2000). Social phobia: diagnosis and epidemiology, neurobiology and pharmacology, comorbidity and treatment. *J Affect Disord* 60: 61-74.
- Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM, Meaney MJ (1998). Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5335-5340.
- Candilis PJ, McLean RY, Otto MW, Manfro GG, Worthington JJ 3rd, Penava SJ, Marzol PC, Pollack MH (1999). Quality of life in patients with panic disorder. *J Nerv Ment Dis* 187: 429-434.
- Canetti L, Bachar E, Galili-Weisstub E, De-Nour AK, Shalev AY (1997). Parental bonding and mental health in adolescence. *Adolescence* 32: 381-394.

- Carobrez AP and Bertoglio LJ (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 1193-1205.
- Cassano GB, Perugi G, Musetti L, Akiskal HS (1989). The nature of depression presenting concomitantly with panic disorder. *Comp Psychiatry* 30: 473-482.
- Charney DS and Manji HK (2004). Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. *Sci STKE* (225). re5.
- Charney DS, Woods SW, Krystal JH, Nagy LM, Heninger GR (1992). Noradrenergic neuronal dysregulation in panic disorder: The effects of intravenous yohimbine and clonidine in panic disorder patients. *Acta Psychiatr Scand* 86: 273-282.
- Cirulli F, Santucci D, Laviola G, Alleva E, Levine S (1994). Behavioral and hormonal responses to stress in the newborn mouse: effects of maternal deprivation and chlordiazepoxide. *Dev Psychobiol* 27: 301-16.
- Collett D (2003). *Modelling binary data*. Chapman and Hall/CRC, Florida.
- Coryell W, Endicott J, Andreasen NC, Keller MB, Clayton PJ, Hirschfeld RM, Scheftner WA, Winokur G (1988). Depression and panic attacks: the significance of overlap as reflected in follow-up and family study data. *Am J Psychiatry* 145: 293-300.

- Costa E, Corda MG, Guidotti (1983). On a brain polypeptide functioning as a putative effector for the recognition sites of benzodiazepine and beta-carboline derivates. *Neuropharmacology* 22: 1481-1492.
- Crawley JN (1981). Neuropharmacological specificity of a simple animal model for the behavior actions of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 15: 695-699.
- Cryan JF and Mombereau C (2004). In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol Psychiatr* 9: 326-357.
- Cryan JF, Markou A, Lucki I (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 23: 238-245.
- Czeh B, Simon M, Schmelting B, Hiemke C, Fuchs E (2006). Astroglial plasticity in the hippocampus is affected by chronic psychosocial stress and concomitant fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 31: 1616-1626.
- D'Aquila P, Brain R, Willner P (1994). Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiol Behav* 45: 750-756.
- D'Aquila PS, Newton J, Willner P (1997). Diurnal variation in the effect of chronic mild stress on sucrose intake and preference. *Physiol Behav* 51: 310-315.

- Dalla C, Edgecomb C, Whetstone AS, Shors TJ (2008). Females do not express learned helplessness like males do. *Neuropsychopharmacology* 33: 1559-1569.
- Davis M (1991). Animal models of anxiety based on classical conditioning: the conditioned emotional response and the fear-potentiated startle effect. In: SE File (Ed.). *Psychopharmacology of anxiolytics and antidepressants*. New York: Pergamon Press, p. 187-212.
- De Angelis L and File SE (1979). Acute and chronic effects of three benzodiazepines in the social interaction anxiety test in mice. *Psychopharmacology* 64: 127-127.
- De Bellis MD, Baum AS, Birmaher B, Keshavan MS, Eccard CH, Boring AM, Jenkins FJ, Ryan ND (1999). Developmental traumatology. Part I: Biological stress systems. *Biol Psychiatry* 45: 1259-1270.
- Deakin JFW and Graeff FG (1991). 5-HT and mechanisms of defence. *J Psychopharmacol* 5: 305-315.
- Deltito JA, Perugi G, Maremmani I, Mignani V, Cassano GB (1986). The importance of separation anxiety in the differentiation of panic disorder from agoraphobia. *Psychiatr Dev* 4: 227-236.
- Deupree D and Hsiao S (1987). Cholecystokinin octapeptide, proglumide, and conditioned taste avoidance in rats. *Physiological Behavior* 41: 125-128.
- Dinan TG (1994). Glucocorticoids and the genesis of depressive illness. A psychobiological model. *Br J Psychiatry* 164: 365-371.

- DinanTG and Scott LV (2005). Anatomy of melancholia: focus on hypothalamic-pituitary–adrenal axis overactivity and the role of vasopressin. *J Anat* 207: 259-264.
- Doerfler LA, Toscano PFJr, Connor DF (2008). Separation anxiety and panic disorder in clinically referred youth. *J Anxiety Disord* 22: 602-611.
- Dolan RJ, Calloway SP, Fonagy P, De Souza FVA, Wakeling A (1985). Life events, depression and hypothalamic- pituitary- adrenal axis function. *Br J Psychiatry* 47: 429-433.
- Dorow R, Horowski R, Paschelke G, Amin M (1983). Severe anxiety induced by FG 7142, a beta-carboline ligand for benzodiazepine receptors. *Lancet* 2: 98-99.
- Dunner DL (1998). The issue of comorbidity in the treatment of panic. *Int Clin Psychopharmacology* 13 Suppl 4: S19-24.
- Dunner DL (2001). Management of anxiety disorders: the added challenge of comorbidity. *Depress Anxiety* 13: 57-71.
- Eaton WW, Kessler RC, Wittchen HU, Magee WJ (1994). Panic and panic disorder in the United States. *Am J Psychiatry* 151: 413-20.
- Edwards E, Johnson J, Anderson D, Turano P, Henn FA (1986). Neurochemical and behavioral consequences of mild, uncontrollable shock: Effects of PCPA. *Pharmacol Biochem Behav* 25: 415-521.
- Eibl-Eibesfeldt, I (1975). *Ethology: The Biology of Behavior*, 2nd Edition, New York: Holt, Rinehart and Winston, Inc.

- El Khoury A, Gruber SHM, Mork A, Mathé AA (2006). Adult life behavioral consequences of early maternal separation are alleviated by escitalopram treatment in a rat model of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30: 535-540.
- Faravelli C and Pallanti S (1989). Recent life events and panic disorder. *Am J Psychiatry* 146: 622-626.
- Faure J, Uys JDK, Marais L, Stein DJ, Daniels WMU (2007). Early maternal separation alters the response to traumatization: resulting in increased levels of hippocampal neurotrophic factors. *Metab Brain Dis* 22: 183-195.
- Fava M and Kendler KS (2000). Major depressive disorder. *Neuron* 28: 335–341.
- Fawcett J. (1992). Suicide risk factors in depressive disorders and in panic disorder. *J Clin Psychiatry* 53: 9-13.
- Fernandes C and File S E (1996). The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 54: 31-40.
- Field T, Healy B, Goldstein S, Perry S, Bendell D, Schanberg S, Zimmerman EA, Kuhn C (1988). Infants of depressed mothers show "depressed" behavior even with nondepressed adults. *Child Dev* 59: 1569-1579.
- File SE (1980). The use of social interaction as a method of detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. *J Neurosci Meth* 2: 219-38.
- File SE (1985). What can be learned from the effects of benzodiazepines on exploratory behavior? *Neurosci Biobehav Rev* 9: 45-54.

- File SE (1988). How good is social interaction as a test of anxiety? In: P Simon, P Soubrie and D Wildlocher (Eds). Selected models of anxiety, depression and psychosis. Karger: Basle, p. 151-166.
- File SE and Hyde JRG (1978). Can social interaction be used to measure anxiety? Br J Pharmacol 62: 19-24.
- File SE and Lister RG (1983). Interactions of ethyl-h-carboline-3-carboxylate and Ro 15-1788 with CGS 8216 in an animal model of anxiety. Neurosci Lett 39: 91-94.
- File SE and Pellow S (1984). The anxiogenic action of Ro 15-1788 is reversed by chronic, but not by acute, treatment with chlordiazepoxide. Brain Res 310: 154-156.
- File SE and Pellow S (1985). Triazolobenzodiazepines antagonize the effects of anxiogenic drugs mediated at three different central nervous system sites. Neurosci Lett 61: 115-119.
- File SE and Zangrossi H Jr (1993). "One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? Psychopharmacology (Berl). 110: 240-244.
- File SE and Seth P (2003). A review of 25 years of the social interaction test. Eur J Pharmacol 463: 35-53.
- File SE, Lister RG, Maninov R, Tucker JC (1984). Intrinsic behavioural actions of n-propyl h-carboline-3-carboxylate. Neuropharmacology 23: 463-466.
- File SE, Lister RG, Nutt DJ (1982). The anxiogenic action of benzodiazepine antagonists. Neuropharmacology 21: 1033-1037.

File SE, Pellow S, Braestrup C (1985). Effects of the h-carboline, FG 7142, in the social interaction test of anxiety and the holeboard: correlations between behaviour and plasma concentrations. *Pharmacol Biochem Behav* 22: 941-944.

File SE, Pellow S, Jensen LH (1986). Actions of the beta-carboline ZK 93426 in an animal test of anxiety and the holeboard: interactions with Ro 15-1788. *J Neural Transm* 65: 103-114.

Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA, Bandler R (2000). Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. *J Comp Neurol* 422: 556-578.

Francis DD and Meaney MJ (1999). Maternal care and the development of stress responses. *Curr Opin Neurobiol* 9: 128-134.

Frank E, Cyranowski JM, Rucci P, Shear MK, Fagiolini A, Thase ME, Cassano GB, Grochocinski VJ, Kostelnik B, Kupfer DJ (2002). Clinical significance of lifetime panic spectrum symptoms in the treatment of patients with Bipolar I Disorder. *Arch Gen Psychiatry* 59: 905-911.

Freud, S. (1896). On the right to separate from neurasthenia a definite symptom-complex as "anxiety neurosis". In: R. M. Hutchins (Editor-in-Chief), *Great Books of the Western World*, vol. 54, *Selected Papers on Hysteria*. Chicago: The Encyclopaedia Britannica, Inc., 1978, p. 25-118.

Furmark T, Tillfors M, Everz P, Marteinsdottir I, Gefvert O, Fredrikson M (1999). Social phobia in the general population: prevalence and



sociodemographic profile. Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol 34: 416-424.

Furukawa T, Yokouchi T, Hirai T, Kitamura T, Takahashi K (1999). Parental loss in childhood and social support in adulthood among psychiatric patients. J Psychiat Res 33: 165-169.

Gardner CR (1985a). Inhibition of ultrasonic distress vocalizations in rat pups by chlordiazepoxide and diazepam. Drug Dev Res 5: 185-193.

Gardner CR (1985b). Distress vocalization in rat pups: a simple screening method for anxiolytic drugs. J Pharmacol Meth 14: 181-187.

Geer JH (1965). The development of a scale to measure fear. Behav Res Ther 3: 45-53.

Genest SE, Gulemetova R, Laforest S, Drolet G, Kinkead R (2003). Neonatal maternal separation and sex-specific plasticity of the hypoxic ventilatory response in awake rat. J Physiol 554: 543-557.

Genest SE, Balon N, Laforest S, Drolet G, Kinkead R (2007a). Neonatal maternal separation and enhancement of the hypoxic ventilatory response in rat: the role of GABAergic modulation within the paraventricular nucleus of the hypothalamus. J Physiol 583: 299-314.

Genest SE, Gulemetova R, Laforest S, Drolet G, Kinkead R (2007b). Neonatal maternal separation induces sex-specific augmentation of the hypercapnic ventilatory response in awake rat. J Appl Physiol 102: 1416-1421.

- Gentil V (1988). The aversive System, 5-HT and panic attacks. In: P Simon, P Soubrié and D Wildlocher (Eds). *Animal Models of Psychiatric Disorders*. Karger: Basel, p. 142-145.
- Gentil V, Tavares S, Gorenstein C, Bello C, Mathias L, Gronich G, Singer J (1990). Acute reversal of flunitrazepam effects by Ro 15-1788 and Ro 15-3505: inverse agonism, tolerance, and rebound. *Psychopharmacology* 100: 54-59.
- Gentsch C, Lichtsteiner M, Feer H (1987). Open field and elevated plus-maze, a behavioral comparison between spontaneously hypertensive (SHR). and wistar-kyoto (WKY). rats and the effects of chlordiazepoxide. *Behav Brain Res* 25: 101-107.
- Giovenardi M, Consiglio AR, Barros HMT, Lucion AB (2000). Pup age and aggressive behavior in lactating rats. *Braz J Med Biol Res* 33: 1083-1088.
- Gittelman-Klein R and Klein DF (1973). School phobia: diagnostic considerations in the light of imipramine effects. *J Nerv Ment Dis* 156: 199-215.
- Gittelman R and Klein DF (1984). Relationship between separation anxiety and panic and agoraphobic disorders. *Psychopathology* 1: 56-65.
- Gittelman R and Klein DF (1985). Childhood separation anxiety and adult agoraphobia. In: AH Tuma and J Masur (Eds). *Anxiety and the anxiety disorders*. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum, p. 389-402.
- Gluckman PD, Hanson MA, Spencer HG, Bateson P (2005). Environmental influences during development and their later consequences for

health and disease: implications for the interpretation of empirical studies. *Proc Biol Sci* 272: 671-677.

Gold PW, Goodwin FK, Chrousos GP (1988a). Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress. *N Engl J Med* 319: 348-353.

Gold PW, Goodwin FK, Chrousos GP (1988b). Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress. *N Engl J Med* 319: 413-420.

Goodwin RD (2002). Anxiety disorders and the onset of depression among adults in the community. *Psychol Med* 32: 1121-1124.

Gorka Z, Moryle E, Papp M (1996). Effect of chronic mild stress on circadian rhythms in the locomotor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 43: 118-123.

Gorman JM (1996). Comorbid depression and anxiety spectrum disorders. *Depress Anxiety* 4: 160-168.

Gorman JM and Coplan JD (1996). Comorbidity of depression and panic disorder. *J Clin Psychiat* 57: S34-S41.

Gorman JM, Liebowitz MR, Fyer AJ, Dillon D, Davies SO, Stein J, Klein DF (1985). Lactate infusions in obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry* 142: 864-866.

Gorman JM, Fyer MR, Liebowitz MR, Klein DF (1987). In: HY Meltzer (Ed.). *Psychopharmacology: the third generation of progress*. New York: Raven Press.

- Graeff FG (2004). Serotonin, the periaqueductal gray and panic, *Neurosci Biobehav Rev* 28: 239-259.
- Graeff FG, Zuardi AW, Giglio JS, Lima Filho EC, Karniol IG (1985). Effect of metergoline on human anxiety. *Psychopharmacology* 86: 334-338.
- Graeff FG, Viana MB, Tomaz C (1993). The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: Effect of diazepam. *Braz J Med Biol Res* 26: 67-70.
- Graeff FG, Netto CF, Zangrossi HJ (1998). The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci Biobehav R* 23: 237-246.
- Graeff FG, Garcia-Leal C, Del-Ben CM, Guimarães FS (2005). Does the panic attack activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *An Acad Bras Cienc* 77: 477-491.
- Grahn RE, Kalman BA, Brennan FX, Watkins LR, Maier SF (1995). The elevated plus-maze is not sensitive to the effect of stressor controllability in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 52: 565-570.
- Grant SJ and Redmond DE Jr (1981). In: Lal H and S Fielding (Eds). *Psychopharmacology of clonidine*. New York: Alan R Liss, p. 5-27.
- Gray JA (1991). *The Psychology of Fear and Stress*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Gray J and McNaughton N (2000). *The neuropsychology of anxiety*. 2n Edition, New York: Oxford University Press Inc.
- Griez E and Schruers K (1998). Experimental pathophysiology of panic. *J Psychosom Res* 45: 493-503.

- Guidotti A, Forchetti CM, Corda MG, Konkel, D, Bennet CD, Costa E (1983). Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 3535.
- Guimarães FS, Zuardi AW, Graeff FG (1987). Effect of chlorimipramine and maprotiline on experimental anxiety in humans. *J Psychopharmacol* 1: 184-192.
- Guimarães FS, Kohem CL, Fillmann HS, de Vecino MCA, de Paoli CL, Ribeiro AMS, Teixeira CC, Wannmache L (1989). A simple simulated public speaking test for evaluating anxiolytic drugs. *Braz J Med Biol Res* 22: 1083-1089.
- Gunnar MR (2003). Integrating neuroscience and psychological approaches in the study of early experiences. *Ann N Y Acad Sci* 1008: 238-247.
- Gutierrez AJL (1996). Ansiedade de separação e transtorno de pânico. *Psiquiatria Biológica* 4: 109-112.
- Guttmacher LB, Murphy DL, Insel TR (1983). Pharmacologic models of anxiety. *Compr Psychiat* 24: 312-26.
- Hall C (1941). Temperament: a survey of animal studies. *Psychol Bull* 38: 909-943.
- Hamilton ME, Zacharko RM, Anisman H (1986). Influence of p-chloramphetamine and methysergide on the escape deficits provoked by inescapable shock. *Psychopharmacology* 90: 203-206.

- Hammack SE, Cooper MA, Lezak KR (2011). Overlapping neurobiology of learned helplessness and conditioned defeat: implications for PTSD and mood disorders. *Neuropharmacology* 1-11.
- Handley SL and McBlane JW (1993). An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. *J Pharmacol Toxicol Meth* 29: 129-138.
- Harvey PO, Le Bastard G, Pochon JB, Levy R, Allilaire JF, Dubois B, Fossati P (2004). Executive functions and updating of the contents of working memory in unipolar depression. *J Psychiat Res* 38: 567-576.
- Heim C and Nemeroff CB (2001). The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry* 49: 1023-1039.
- Heinrichs SC, Pich EM, Miczek KA, Britton KT, Koob GF (1992). Corticotropin-releasing factor antagonist reduces emotionality in socially defeated rats via direct neurotropic action. *Brain Res* 581: 190-197.
- Hendrie CA and Dourish, CT (1990). Anxiolytic profile of the cholecystokinin antagonist devazepide in mice. *Brit J Pharmacol* 99: 138.
- Henn FA and Vollmayr B (2005). Stress models of depression: forming genetically vulnerable strains. *Neurosci and Biobehavi R* 29: 799-804.
- Hihn H, Baune BT, Michael N, Markowitsch H, Arolt V, Pfleiderer B (2006). Memory performance in severely depressed patients treated by electroconvulsive therapy. *J ECT* 22: 189-195.

- Hofer MA (1996). Multiple regulators of ultrasonic vocalization in the infant rat. *Psychoneuroendocrinology* 21: 203-217.
- Howard JL and Pollard GT (1991). Effects of drugs on punished behavior: preclinical test for anxiolytics. In: SE File (Ed.). *Psychopharmacology of anxiolytics and antidepressants*. New York: Pergamon Press, p. 131-153.
- Hughes J, Boden P, Costall B, Domeney A, Kelly E, Horwell DC (1990). Development of a class of selective cholecystinin type B receptor antagonists having potent anxiolytic activity. *P Natl Acad Sci USA* 87: 6728-6732.
- Huot RL, Thirivikraman KV, Meaney MJ, Plotsky PM (2001). Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology* 158: 366-373.
- Huston JP, Schulz D, Topic B (2009). Toward an animal model of extinction-induced despair: focus on aging and physiological indices. *J Neural Transm* 116: 1029-1036.
- Insel TR, Hill, JL, Maylor RB (1986). Rat pub ultrasonic isolation calls: possible mediation by benzodiazepine receptor complex. *Pharmacol Biochem Behav* 24: 1263-1267.
- Jancsar SM and Leonard BE (1983). Behavioural and neurochemical interactions between chronic reserpine and chronic antidepressants. A possible model for the detection of atypical antidepressants. *Biochem Pharmacol* 32: 1569-1571.

- Jancsar S and Leonard BE (1984). Changes in neurotransmitter metabolism following olfactory bulbectomy in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 8: 263-269.
- Jenck F, Moreau JL, Martin JR (1995). Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry Res* 57: 181-191.
- Jesberger JA and Richardson JS (1986). Effects of antidepressant drugs on the behavior of olfactory bulbectomized and sham-operated rats. *Behav Neurosci* 100: 256-274.
- Jesberger JA and Richardson JS (1988). Brain output dysregulation induced by olfactory bulbectomy: an approximation in the rat of major depressive disorder in humans? *Int J Neurosci* 38: 241-265.
- Johnson MR and Lydiard RB (1998). Comorbidity of major depression and panic disorder. *J Clin Psychol* 54: 201-210.
- Joyce PR, Bushnell JA, Oakley-Browne MA, Wells JE, Hornblow AR (1989). The epidemiology of panic symptomatology and agoraphobic avoidance. *Compr Psychiatry* 30: 303-312.
- Kagan J, Reznick JS, Snidman N, Gibbons J, Johnson MO (1988). Childhood derivatives of inhibition and lack of inhibition to the unfamiliar. *Child Development* 59: 1580-1589.
- Katz RJ and Schmaltz K (1980). Dopaminergic involvement in attention. A novel animal model. *Prog Neuropsychopharmacol* 4: 585–590.



- Katz RJ, Roth KA, Schmaltz K (1981). Amphetamine and tranylcypromine in an animal model of depression: pharmacological specificity of the reversal effect. *Neurosci Biobehav Rev* 5: 259–264.
- Kaufman J and Charney D (2000). Comorbidity of mood and anxiety disorders. *Depress Anxiety* 12: 69-76.
- Kaunonen M, Paivi AK, Paunonen M, Erjanti H (2000). Death in the Finnish family: experiences of spousal bereavement. *Int J Nurs Pract* 6: 127-134.
- Kelly JP, Wrynn AS, Leonard BE (1997). The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: an update. *Pharmacol Ther* 74: 299-316.
- Kendler KS and Karkowski-Shuman L (1997). Stressful life events and genetic liability to major depression: genetic control of exposure to the environment? *Psychol Med* 27: 539-547.
- Kendler KS, Neale MC, Kessler RC, Heath AC, Eaves LJ (1992). Childhood parental loss and adult psychopathology in women. A twin study perspective. *Arch Gen Psychiatry* 49: 109-116.
- Kendler KS, Walters EE, Truett KR, Heath AC, Neale MC, Martin NG, Eaves LJ (1994). Sources of individual differences in depressive symptoms: analysis of two samples of twins and their families. *Am J Psychiatry* 151: 1605-1614.
- Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA (1999). Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry* 156: 837-841.

- Kendler KS, Thornton LM, Gardner CO (2001). Genetic risk, number of previous depressive episodes, and stressful life events in predicting onset of major depression. *Am J Psychiatry* 158: 582-586.
- Kennedy SH (2008). Core symptoms of major depressive disorder: relevance to diagnosis and treatment. *Dialogues Clin Neurosci* 10: 271-277.
- Kent JM, Papp LA, Martinez JM, Browne ST, Coplan JD, Klein DF, Gorman JM, (2001). Specificity of Panic Response to CO<sub>2</sub> Inhalation in Panic Disorder: A Comparison With Major Depression and Premenstrual Dysphoric Disorder. *Am J Psychiatry* 158: 58-67.
- Kessler RC (1997). The effects of stressful life events on depression. *Ann Rev Psychol* 48: 191-214.
- Kessler RC, McGonagle KA, Zhao S, Nelson CB, Hughes M, Eshleman S, Wittchen HU, Kendler KS (1994). Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry* 51: 8-19.
- Kinley DJ, Walker JR, Murray W, Enns MW, Sareen J (2011). Panic attacks as a risk for later psychopathology: results from a nationally representative survey. *Depress Anxiety* 0: 1-8.
- Klauke B, Deckert J, Reif A, Pauli P, Domschke K (2010). Life events in panic disorder – an update on “candidate stressors”. *Depress Anxiety* 27: 716-730.
- Klein DF (1980). Anxiety reconceptualized: early experience with imipramine and anxiety. *Compr Psychiatry* 2: 411-427.

- Klein DF (1993a). Panic may be a misfiring suffocation alarm. In: SA Montgomery (Ed.). *Psychopharmacology of panic*. New York: Oxford University Press, p. 67-73.
- Klein DF (1993b). False suffocation alarms, spontaneous panics, and related conditions. An integrative hypothesis. *Arch Gen Psychiatry* 50: 306-318.
- Klein DF (1995). Respiration disorders in panic attacks. *J Am Med Assoc* 274(19). 1504.
- Klein DF and Fink M (1962). Psychiatric patterns to imipramine. *Am J Psychiat* 119: 432-438.
- Klein D and Brown TS (1969). Exploratory behavior and spontaneous alternation in blind and anosmic rats. *J Comp Physiol Psychol* 68: 107-110.
- Kraemer GW, Ebert MH, McKinney WT (1983). Separation models and depression. In: J Angst (Ed.). *The origins of depression: current concepts and approaches*. Berlin: Springer-Verlag, p. 133-146.
- Krsiak M, Sulcova A, Donat P, Tomasikova Z, Dlohozkova N, Kosar E, Masek K (1984). Can social and agonist interactions be used to detect anxiolytic activity of drugs? In: KA Miczek, MR Cruz, B Olivier (Eds). *Ethopharmacological aggression research*. New York: Alan Liss, p. 93-114.
- Kuhn CM and Schanberg SM (1998). Responses to maternal separation mechanisms and mediators. *Int J Dev Neuroscience* 16: 261-270.

- Kulkarni SK and Dhir A (2007). Effect of various classes of antidepressants in behavioral paradigms of despair. *Prog Neuro-Psychoph* 31: 1248-1254.
- Lambás-Señas L, Mnie-Filali O, Certin V, Faure C, Lemoine L, Zimmer L, Haddjeri N (2009). Functional correlates for 5-HT(1A) receptors in maternally deprived rats displaying anxiety and depression-like behaviors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33: 262-268.
- Lapierre YD, Knott VJ, Gray R (1984). Psychophysiological correlates of sodium lactate. *Psychopharmacol Bull* 20: 50-57.
- Larsson K (1971). Impaired mating performance in male rats after anosmia induced peripherally or centrally. *Brain Behav Evol* 4: 463-471.
- Lecrubier Y (1998). The impact of comorbidity on the treatment of panic disorder. *J Clin Psychiatry*. 59 (Suppl 8): 11-14.
- Lecrubier Y and Ustün TB (1998). Panic and depression: a worldwide primary care perspective. *Int Clin Psychopharmacol* 13 (Suppl 4): S7-11.
- Lee JH, Kim HJ, Kim JG, Ryu V, Kim BT, Kang DW, Jahng JW (2007). Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. *Neurosci Res* 58: 32-39.
- Lehmann J and Feldon J (2000). Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Rev Neurosci* 11: 383-408.

- Leonard B E, Earley C J, Egan J (1979). Neurochemical and behavioural aspects of olfactory bulbectomy in the rat. *Biol. Aspects Learning* 5: 153-162.
- Levine S, Johnson DF, Gonzalez CA (1985). Behavioral and hormonal responses to separation in infant rhesus monkeys and mothers. *Behav Neurosci* 99: 399-410.
- Liebowitz MR, Gorman JM, Fyer AJ, Levitt M, Dillon D, Levy G, Appleby IL, Anderson S, Palij M, Davies SO (1985a). Lactate provocation of panic attacks. II. Biochemical and physiological findings. *Arch Gen Psychiat* 42: 709-719.
- Liebowitz MR, Gorman JM, Fyer AJ, Klein DF (1985b). Social phobia. Review of a neglected anxiety disorder. *Arch Gen Psychiatry* 42: 729-736.
- Liebowitz MR, Karoum F, Quitkin FM, Davies SO, Schwartz D, Levitt M, Linnoila M (1985c). Biochemical effects of L-deprenyl in atypical depressives *Biol Psychiatry* 20: 558-565
- Lipsitz JD, Martin LY, Mannuzza S, Chapman TF, Liebowitz MR, Klein DF, Fyer AJ (1994). Childhood separation anxiety disorder in patients with adult anxiety disorders. *Am J Psychiatry* 151: 927-929.
- Lister RG (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92: 180-185.
- Lister RG and Hilakivi LA (1988). The effects of novelty, isolation, light and ethanol on the social behavior of mice. *Psychopharmacology* 96: 181-187.

- Lumia AR, Teicher MH, Salchli F, Ayers E, Possidente B (1992). Olfactory bulbectomy as a model for agitated hyposerotonergic depression. *Brain Res* 587: 181-185.
- Maas JW, Hattox SE, Green NM, Landis DH (1977). A direct method for studying 3-methoxy-4-hydroxyphenethyleneglycol (MHPG). by brain in awake animals. *Eur J Pharmacol* 46: 221-228.
- Maier SF (1984). Learned helplessness and animal models of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 8: 435-446.
- Maier SF (2001). Exposure to the stressor environment prevents the temporal dissipation of behavioral depression/learned helplessness. *Biol Psychiatry* 49: 763-773.
- Maier SF and Watkins LR (2005). Stressor controllability and learned helplessness: The roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neurosci Biobehav R* 29: 829-841.
- Maier SF and Watkins LR (2010). Role of the medial prefrontal cortex in coping and resilience. *Brain Res* 1355: 52-60.
- Maier SF, Silbert LH, Woodmansee WW, Desan PH (1990). Adinazolam both prevents and reverses the long-term reduction of daily activity produced by inescapable shock. *Pharmacol Biochem Behav* 36: 767-773.
- Maier SF, Grahn RE, Kalman BA, Sutton LC, Wiertelak EP, Watkins LR (1993). The role of the amygdala and dorsal raphe nucleus in mediating the behavioral consequences of inescapable shock. *Behav Neurosci* 107: 377-388.

- Maier SF, Grahn RE, Watkins LR (1995). 8-OH-DPAT microinjected in the region of the dorsal raphe nucleus blocks and reverses the enhanced fear conditioning and the interference with escape produced by exposure to inescapable shock. *Behav Neurosci* 109: 404-412.
- Maier SF, Amat J, Baratta MV, Paul E, Watkins LR (2006). Behavioral control, the medial prefrontal cortex, and resilience. *Dialogues Clin Neurosci* 8: 397-406.
- Manicavasagar V, Silove D, Hadzi-Pavlovic D (1998). Subpopulations of early separation anxiety: relevance to risk of adult anxiety disorders. *J Affect Disorders* 48: 181-190.
- Manicavasagar V, Silove D, Curtis J, Wagner R (2000). Continuities of separation anxiety from early life into adulthood. *J Anxiety Disord* 14: 1-18.
- Manicavasagar V, Silove D, Rapee R, Waters F, Momartin S (2001). Parent-child concordance for separation anxiety: a clinical study. *J Affect Disord* 65: 81-4.
- Manicavasagar V, Silove D, Wagner R, Drobny J (2003). A self-report questionnaire for measuring separation anxiety in adulthood. *Compr Psychiat* 44:146-153.
- Mann JJ (1999). Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior. *Neuropsychopharmacology* 21: 99S-105S.
- Marais L, Van Rensburg SJ, van Zyl JM, Stein DJ, Daniels WMU (2008). Maternal separation of rat pups increases the risk of developing

depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neurosci Res* 61: 106-112.

Maren S (2007). The Threatened Brain. *Science* 317: 1043-1044.

Mattis SG and Ollendick TH (1997). Children's cognitive responses to the somatic symptoms of panic. *J Abnorm Child Psychol* 25: 47-57.

McCauley J, Kern DE, Kolodner K, Dill L, Schroeder AF, DeChant HK, Ryden J, Derogatis LR, Bass EB (1997). Clinical characteristics of women with a history of childhood abuse: unhealed wounds. *JAMA* 277: 1362-1368.

McNair DM, Frankenthaler LM, Czerlinsky T, White TW, Sasson S, Fisher S (1982). Simulated public speaking as a model of clinical anxiety. *Psychopharmacology* 77: 7-10.

Meaney MJ (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci* 24: 1161-1192.

Meaney MJ, Aitken D, Sharma S, Viau V (1992). Basal ACTH, corticosterone, and corticosterone-binding globulin levels over the diurnal cycle, and hippocampal type I and type II corticosteroid receptors in young and old, handled and nonhandled rats. *Neuroendocrinology* 55: 204-213.

Meaney MJ, Bhatnagar S, Diorio J, Larocque S, Francis D, O'Donnell D, Shanks N, Sharma S, Smythe J, Viau V (1993). Molecular basis for the development of individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response. *Cell Mol Neurobiol* 13: 321-347.



- Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Widdowson J, LaPlante P, Caldji C, Sharma S, Seckl JR, Plotsky PM (1996). Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci* 18: 49-72.
- Mendlowicz MV and Stein MB (2000). Quality of life in individuals with anxiety disorders. *Am J Psychiatry* 157: 669-682.
- Mezzasalma MA, Valença AM, Lopes FL, Nascimento I, Zin WA, Nardi AE (2004). Neuroanatomy of panic disorder. *Rev Bras Psiquiatr* 26: 202-6.
- Overstreet DH (1993). The Flinders sensitive line rats: a genetic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 17: 51-68.
- Miller WR and Seligman ME (1975). Depression and learned helplessness in man. *J Abnorm Psychol* 84: 228-238.
- Milrod B, Leon AC, Shear MK (2004). Can interpersonal loss precipitate panic disorder? *Am J Psychiatry* 161: 758-759.
- Mobbs D, Petrovic P, Marchant JL, Hassabis D, Weiskopf N, Seymour B, Dolan RJ, Frith CD (2007). When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. *Science* 317: 1079-1083.
- Mroczkowski MM, Goes FS, Riddle MA, Grados MA, Bienvenu OJ, Greenberg BD, Fyer AJ, McCracken JT, Rauch SL, Murphy DL, Knowles JA, Piacentini J, Cullen B, Rasmussen SA, Geller DA, Pauls DL, Liang KY, Nestadt G, Samuels JF (2011). Separation anxiety disorder in OCD. *Depress Anxiety* 28: 256-262.

- Nascimento JOG, Zangrossi HJr. Viana MB (2010). Effects of reversible inactivation of the dorsomedial hypothalamus on panic- and anxiety-related responses in rats. *Braz J Med Biol Res* 43: 869-873.
- Nashold BSJr, Wilson WP, Slaughter DG (1969). Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg* 30: 14-24.
- Nashold BSJr, Wilson N P, Slaughter G S (1974) The midbrain and pain. In Bonica JJ (Ed.) *Advances in Neurology*, Vol 4: International symposium on pain. New York: Raven Press, p.191-196.
- Nesterova IV, Gurevich EV, Nesterov VI, Otmakhovaz NA, Bobkova NV (1997). Bulbectomy-induced loss of raphe neurons is counteracted by antidepressant treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiat* 21: 127-140.
- Newman JD (1991). Vocal manifestations of anxiety and their pharmacological control. In: SE File (Ed.). *Psychopharmacology of anxiolytics and antidepressants*. New York: Pergamon Press, p. 251-260.
- Newport DJ, Stowe ZN, Nemeroff CB (2002). Parental depression: animal models of an adverse life event. *Am J Psychiatry* 159: 1265-1283.
- Nutt DJ, Glue P, Lawson C, Wilson S (1990). Flumazenil provocation of panic attacks. *Arch Gen Psychiatry* 47: 917-925.
- Ossenkopp KP, Sorenson L, Mazmanian DS (1994). Factor analysis of open-field behavior in the rat (*Rattus norvegicus*): application of the three-way PARAFAC model to a longitudinal data set. *Behav Proc* 31: 129-144.

- Overmier JB and Seligman MEP (1967). Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance learning. *J Comp Physiol Psychol* 63: 23-33.
- Overstreet DH (1993). The Flinders sensitive line rats: a genetic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 17: 51-68.
- Palanza P (2001). Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neurosci Biobehav Rev* 25: 219-233.
- Palma SM, Guimarães FS, Zuardi AW (1994). Anxiety induced by simulated public speaking and Stroop Colour Word Test in healthy subjects: effects of different trait-anxiety levels. *Braz J Med Biol Res* 27: 2895-2902.
- Paxinos G and Watson C (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.
- Pellow S and File SE (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects in exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 24: 525-529.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Meth* 14: 149-167.
- Petty F and Sherman AD (1983). Learned helplessness induction decreases in vivo cortical serotonin release. *Pharmacol Biochem Behav* 18: 649-660.

- Phillips GC, Jones GE, Rieger ER, Snell JB (1997). Normative data for the personal report of confidence as a speaker. *J Anxiety Disord* 11: 215-220.
- Pine DS, Klein RG, Coplan JD, Papp LA, Hoven CW, Martinez J, Kovalenko P, Mandell DJ, Moreau D, Klein DF, Gorman JM (2000). Differential carbon dioxide sensitivity in childhood anxiety disorders and nonill comparison group. *Arch Gen Psychiatry* 57: 960-967.
- Pine DS, Klein RG, Roberson-Nay R, Mannuzza S, Moulton JL 3<sup>rd</sup>, Woldehawariat G, Guardino M (2005). Response to 5% carbon dioxide in children and adolescents: relationship to panic disorder in parents and anxiety disorders in subjects. *Arch Gen Psychiatry* 62: 73-80.
- Pinheiro SN, Del-Ben CM, Zangrossi HJr, Graeff FG (2008). Anxiolytic and panicolytic effects of escitalopram in the elevated T-maze. *J Psychopharmacol* 22: 132-137.
- Pitts FN and McClure JN (1967). Lactate metabolism in anxiety neurosis. *N Engl J Med* 277: 1329-1336.
- Plotsky PM and Meaney MJ (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 18: 195-200.
- Poltronieri SC, Zangrossi HJr, de Barros Viana M (2003). Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. *Behav Brain Res* 147(1-2): 185-192.

- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266: 730-2.
- Porsolt RD, Lenègre A, McArthur RA (1991). Pharmacological models of depression. In: Olivier B, Slangen J and Mos J (Eds.). *Animal Models in Psychopharmacology*. Basle: Birkhaeuser-Verlag, p. 137-161.
- Post RM (1992). Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. *Am J Psychiatry* 149: 999-1010.
- Preter M and Klein DF (2008). Panic, suffocation false alarms, separation anxiety and endogenous opioids, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 32: 603-612.
- Preter M, Lee SH, Petkova E, Vannucci M, Kim S, Klein DF (2011). Controlled cross-over study in normal subjects of naloxone-preceding-lactate infusions, respiratory and subjective responses: relationship to endogenous opioid system, suffocation false alarm theory and childhood parental loss. *Psychol Med* 41: 385-393.
- Pryce CR and Feldon J (2003). Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neurosci Biobeh Rev* 27: 57-71.
- Ramos A and Mormède P (1998). Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci Biobehav Rev* 22: 33-57.
- Ramos A, Berton O, Mormède P, Chaouloff F (1997). A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav Brain Res* 85: 57-69.

- Reiman EM, Raichle ME, Robins E, Mintun MA, Fusselman MJ, Fox PT, Price JL, Hackman KA (1989). Neuroanatomical correlates of a lactate-induced anxiety attack. *Arch Gen Psychiat* 46: 493-500.
- Repetti RL, Taylor SE, Seeman TE (2002). Risky families: family social environments and the mental and physical health of offspring. *Psychol Bull* 128: 330-366.
- Rifkin A, Klein DF, Dillon D, Levitt M (1981). Blockade by imipramine or desipramine of panic induced by sodium lactate. *Am J Psychiat* 138: 676-677.
- Rinne T, Westenberg HGM, den Boer JA, van den Brink W (2000). Serotonergic blunting to meta-chlorophenylpiperazine (m-CPP). highly correlates with sustained childhood abuse in impulsive and autoaggressive female borderline patients. *Biol Psychiatry* 47: 548-556.
- Rodgers RJ and Cole JC (1993). Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors. *Physiol Behav* 53: 383-388.
- Romeas T, Morissette MC, Mnie-Filali O, Piñeyro G, Boye SM (2009). Simultaneous anhedonia and exaggerated locomotor activation in an animal model of depression. *Psychopharmacology* 205: 293-303.
- Schenberg LC (2010). Towards a translational model of panic attack. *Psychol Neurosci* 3: 9-37.
- Schenberg LC, Vasquez EC, Costa MB (1993). Cardiac baroreflex dynamics during the defence reaction in freely moving rats. *Brain Res* 621: 50-58.

- Schenberg LC, Marçal LPA, Seeberger F, Barros MR, Sudre ECM (2000). L-type calcium channels selectively control the defensive behaviors induced by electrical stimulation of dorsal periaqueductal gray and overlying collicular layers. *Behav Brain Res* 111: 175-185.
- Schenberg LC, Bittencourt AS, Sudré EC, Vargas LC (2001). Modeling panic attacks. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 647-659.
- Schenberg LC, Capucho LB, Vatanabe RO, Vargas LC (2002). Acute effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked unconditioned defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology* 159: 138-144.
- Schenberg LC, Póvoa RMF, Costa ALP, Caldellas AV, Tufik S, Bittencourt AS (2005). Functional specializations within the tectum defense systems of the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 279-1298.
- Schimitel FG, Almeida GM, Pitol DN, Tufik S, Schenberg LC (2011). Evidence of a suffocation alarm system within the periaqueductal gray matter of the rat. *Neuroscience* (submetido para publicação).
- Schulz D, Buddenberg T, Huston JP (2007). Extinction-induced "despair" in the water maze, exploratory behavior and fear: effects of chronic antidepressant treatment. *Neurobiol Learn Mem* 87: 624-634.
- Seligman MEP (1975). *Helplessness: on depression, development and death*. San Francisco: WH Freeman.
- Seligman MEP and Maier SF (1967). Failure to escape traumatic shock. *J Abnorm Psychol* 74: 1-9.

- Seligman MEP, Rossellini RA, Kozak M (1975). Learned helplessness in the rat: reversibility, time course and immunization. *J Comp Physiol Psychol* 88: 542-547.
- Shalev U and Kafkafi N (2002). Repeated maternal separation does not alter sucrose-reinforced and open-field behaviors. *Pharmacol Biochem Behav* 73: 115-122.
- Shavitt RG, Gentil V, Mandetta R (1992). The association of panic/agoraphobia and asthma. Contributing factors and clinical implications. *Gen Hosp Psychiat* 14: 420-423.
- Sherman AD and Petty F (1980). Neurochemical basis of the action of antidepressants on learned helplessness. *Behav Neural Biol* 30: 119-134.
- Silove D, Manicavasagar V, Curtis J, Blaszczyński A (1996). Is early separation anxiety a risk factor for adult panic disorder? a critical review. *Compr Psychiatry* 37: 167-179.
- Siqueira CC, Rossoni RR, Schenberg LC (2010). Dorsal periaqueductal gray matter-evoked panic-like behaviors are markedly inhibited by a low peripheral dose of thyrotropin releasing hormone. *Psychoneuroendocrinology* 35: 262-271.
- Song C and Leonard BE (1995). The effect of olfactory bulbectomy in the rat, alone or in combination with antidepressants and endogenous factors, on immune function. *Hum Psychopharmacol* 10: 7-18.
- Song C and Leonard BE (2005). The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 627-647.



- Song C, Earley B, Leonard BE (1996). The effects of central administration of neuropeptide Y on behavior, neurotransmitter, and immune functions in the olfactory bulbectomized rat model of depression. *Brain Behav Immun* 10: 1-16.
- Souza AM (1996). Estudo da associação entre ansiedade de separação e transtorno de pânico. Dissertação de Mestrado, Departamento de Psicologia e Psiquiatria Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.
- Steenbergen HL, Heinsbroek RP, Van Hest A, Van de Poll NE (1990). Sex-dependent effects of inescapable shock administration on shuttlebox-escape performance and elevated plus-maze behavior. *Physiol Behav* 48: 571-576.
- Steenbergen HL, Farabollini F, Heinsbroek RP, Van de Poll NE (1991). Sex-dependent effects of aversive stimulation on holeboard and elevated plus-maze behavior. *Behav Brain Res* 43: 159-165.
- Stein MB, Walker JR, Forde DR (1994). Setting diagnostic thresholds for social phobia: considerations from a community survey of social anxiety. *Am J Psychiat* 151: 408-412.
- Stein MB, Walker JR, Forde DR (1996). Public-speaking fears in a community sample. Prevalence, impact on functioning, and diagnostic classification. *Arch Gen Psychiat* 53: 169-174.
- Stéru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 85: 367-370.

- Stéru L, Chermat R, Thierry B, Mico JA, Lenègre A, Stéru M, Simon P, Porsolt RD (1987). The automated tail suspension test: a computerized device which differentiates psychotropic drugs. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 11: 659-671.
- Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS (2000). Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am J Psychiatry* 157: 1552-1562.
- Tafet GE and Bernardini R (2003). Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27: 893-903.
- Teicher MH, Andersen SL, Polcari A, Anderson CM, Navalta CP, Kim DM (2003). The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment. *Neurosci Biobehav Rev* 27: 33-44.
- Teixeira RC, Zangrossi H, Graeff FG (2000). Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 65: 571-576.
- Van der Molen GM, Van den Hout MA, Van Dieren AC, Griez E (1989). Childhood separation anxiety and adult-onset panic disorders. *J Anxiety Disord* 3: 97-106.
- Van Riezen H and Leonard BE (1990). Effects of psychotropic drugs on the behavior and neurochemistry of olfactory bulbectomized rats. *Pharmacol Ther* 47: 21-34.

- Van Oers HJJ, de Kloet ER, Li C, Levine S (1998). The ontogeny of glucocorticoid negative feedback: influence of maternal deprivation. *Endocrinology* 139: 2838-2846.
- Vargas LC and Schenberg LC (2001). Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked innate defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology* 155: 260-268.
- Velbinger K, De Vry J, Jentsch K, Eckert A, Henn F, Müller WE (2000). Acute stress induced modifications of calcium signaling in learned helpless rats. *Pharmacopsychiatry* 33: 132-137.
- Vellucci SV (1991). Primate social behavior: anxiety or depression. In: SE File (Ed.). *Psychopharmacology of anxiolytics and antidepressants*. New York: Pergamon Press, p. 83-105.
- Viana MB, Tomaz C, Graeff FG (1994). The elevated T-maze: an animal model of anxiety and memory. *Pharmacol Biochem Behav* 49: 549-554.
- Vollmayr B, Bachteler D, Vengeliene V, Gass P, Spanagel R, Henn F (2004). Rats with congenital learned helplessness respond less to sucrose but show no deficits in activity or learning. *Behav Brain Res* 150: 217-221.
- Watanabe A, Tohyama Y, Nguyen KQ, Hasegawa S, Debonnel G, Diksic M (2003). Regional brain serotonin synthesis is increased in the olfactory bulbectomy rat model of depression: an autoradiographic study. *J Neurochem* 85: 469-475.

- Widom CS, DuMont K, Czaja SJ (2007). Prospective investigation of major depressive disorder and comorbidity in abused and neglected children grown up. *Arch Gen Psychiatry* 64: 49-56.
- Willner P (1984). The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology* 83: 1-16.
- Willner P (1986). Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 10: 677-690.
- Willner P (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology* 134: 319-29.
- Willner P and Papp M (1997). Animal models to detect antidepressants: are new strategies necessary to detect new agent? In: P Skolnick (Ed.). *Antidepressants: current trends and future directions*. New York: The Humana Press Inc.
- Woods SW, Charney DS, Delgado PL, Heninger GR (1990). The effect of long-term imipramine treatment on carbon dioxide-induced anxiety in panic disorder patients. *J Clin Psychiat* 51: 505-507.
- Yan HC, Cao X, Das M, Zhu XH, Gao TM (2010). Behavioral animal models of depression. *Neurosci Bull* 26: 327-337.
- Yeragani VK, Pohl R, Balon R, Rainey JM, Berchou R, Ortiz A (1988). Sodium lactate infusion after treatment with tricyclic antidepressants: behavioral and physiological findings. *Biol Psychiat* 24: 767-774.

Zangrossi HJr and File SE (1992). Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor. *Brain Res Bull* 29: 381-388.

Zangrossi HJ and Graeff FG (1997). Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. *Brain Res Bull* 44: 1-5.

Zimmerberg B, Kim JH, Davidson AN, Rosenthal AJ (2003). Early deprivation alters the vocalization behavior of neonates directing maternal attention in a rat model of child neglect. *Ann N Y Acad Sci* 1008: 308-313.

Zuardi AW, Cosme RA, Graeff FG, Guimarães FS (1993). Effects of ipsapirone and cannabidiol on human experimental anxiety. *J Psychopharmacol* 7: 82-88.